

УДК 57.045:576.33

Т. А. Борисова, Н. Г. Позднякова, Н. В. Крысанова, Н. Г. Гиммельрейх

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, Київ

ГАМК и глутамат: экзоцитоз и Na^+ -зависимое освобождение из нервных окончаний головного мозга в экстремальных условиях

Надійшло до редакції 01.07.04

Вперше показано, що гіпергравітаційний стрес, викликаний обертанням піддослідних тварин (щурів) протягом 1 год у центрифугі великого радіуса з прискоренням 10 g, впливає на синаптичні процеси в мозку, зокрема на вивільнення ^3H ГАМК, основного гальмівного нейромедіатора, та L- ^{14}C глутамату, основного збуджуючого нейромедіатора. Досліджували вивільнення медіаторів з везикульованого та невезикульованого (цитоплазматичного) пулів нервових закінчень головного мозку щурів. Порівняльний аналіз вивільнення ГАМК та глутамату показує, що під впливом гіпергравітаційного навантаження ці процеси зазнають різних змін. Після гравітаційного навантаження вивільнення глутамату за рахунок кальцій-стимульованого процесу екзоцитозу значно зменшувалося: з $14.4 \pm 0.7\%$ до $6.2 \pm 1.9\%$ ($P \leq 0.05$), але істотно збільшувалося вивільнення ГАМК: з $7.2 \pm 0.5\%$ до $11.74 \pm 1.2\%$ ($P \leq 0.05$).

Гравитация является единственным фактором окружающей среды, который остается практически неизменным на протяжении всего эволюционного периода. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что длительное пребывание в условиях измененной гравитации приводит к изменениям функциональной активности многих систем в организме животных, в том числе центральной нервной системы.

В центральной нервной системе млекопитающих у-аминомасляной кислоте (ГАМК) и L-глутамату присущи нейромедиаторные функции: взаимодействие L-глутамата со специфическим синаптическим рецептором обеспечивает передачу возбуждающих сигналов, а взаимодействие ГАМК — ингибиторных. Исследованиями последних лет показано также, что в процессе нейротрансмиссии важную модуляторную роль играет взаимодействие этих нейромедиаторных аминокислот с рецепторами нервных терминалей, которые не формируют синапсов, внесинаптическими. В результате такого взаимодействия L-глутамат может модулировать гамкэргические процессы, и наоборот, ГАМК может влиять на интенсивность глутаматэргических процессов [17]. Сбалансированность возбуждающих и ингибирующих событий чрезвычайно важна для развития нервной системы и обеспечивает физиологическую базу для хранения информации [6].

Дисбаланс может привести к различным неблагоприятным последствиям — от судорог или нейротоксичности до депрессии центральной нервной системы.

Ключевым этапом процесса нейротрансмиссии является освобождение нейромедіатора из пресинаптической терминали, ведущее к повышению концентрации нейромедіатора в синаптической щели и активации специфических рецепторов. Основным механизмом выделения нейромедіатора из пресинапса является процесс экзоцитоза. Экзоцитоз — это сложный многостадийный процесс, в результате которого происходит слияние синаптических везикул с плазматической мембраной и освобождение содержимого везикул в синаптическую щель. Пусковым моментом экзоцитоза является повышение концентрации Ca^{2+} в пресинапсе за счет вызванной потенциалом действия активации потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов и входа внесклеточного Ca^{2+} . Однако, как показано недавними исследованиями, экзоцитоз не является единственным механизмом, благодаря которому нейромедіаторы могут выделяться во внесклеточное пространство. Предполагают, что значительная часть освобожденного глутамата имеет невезикулярное происхождение [8]. В этом случае освобождение нейромедіаторов не требует повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} и происходит за счет работы специфических транспортеров, которые локализо-

ваны в плазматической мембране пресинаптических нервных окончаний [9, 11]. Основная функция транспортеров — поддержание концентрации нейромедиатора в синаптической щели на низком уровне, однако при некоторых физиологических состояниях транспортеры могут работать в обратном направлении, перенося нейромедиатор из цитозольного пула в синаптическую щель. По-видимому, мембранные транспортеры выполняют сложные функции модуляции нейротрансмиссии.

Известно, что нарушения регуляции содержания глутамата в синаптической щели приводят к хроническому возбуждению нейрона. Глутаматэргическая сверхстимуляция может разрушать нейроны. Недавно введен в обращение термин «глутаматная нейротоксичность». Причиной глутаматной нейротоксичности является связывание глутамата с его рецепторами, результатом чего является значительное массивированное увеличение концентрации цитоплазматического кальция. Нарушения, возникающие в процессе поглощения и освобождения ГАМК и глутамата, могут быть вовлечены в патогенез нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, шизофрения, эпилепсия и др. При мозговых травмах и ишемии также наблюдаются нарушения трансмиссии этих нейромедиаторов [5].

Целью этого исследования было изучение процессов, лежащих в основе передачи нервного импульса, у животных, которые находились в условиях измененной гравитации. Это необходимо для понимания основ синаптической пластичности. Литературные данные свидетельствуют, что как у животных, так и у людей, которые подвергались гипергравитационной перегрузке с использованием центрифуги, наблюдались изменения мозгового кровообращения и насыщения артериальной крови кислородом. Такие изменения могут быть причиной гипоксических нарушений в мозгу [7, 13—15].

Наши эксперименты были проведены на отделенных от аксонов нервных окончаниях-синапсосамах, выделенных из больших полушарий головного мозга крыс дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности. Синапсосомы обладают такими характеристиками интактного нервного окончания, как мембранный потенциал, способность к активному накоплению нейромедиаторов, способность к освобождению нейромедиаторов при деполяризации мембраны. Основная задача исследования состояла в сравнительном анализе процесса освобождения [³H]ГАМК и L-[¹⁴C]глутамата из синапсосом, выделенных из мозга животных, пребывающих в обычных земных условиях или в условиях моделированной гравитации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гипергравитационный стресс у половозрелых самцов крыс Wistar весом 100—120 г моделировали центрифугированием с ускорением 10g (диаметр центрифуги 5 м) в специальных контейнерах в течение 1 ч. Синапсосомы из больших полушарий головного мозга крыс выделяли сразу после окончания гравитационной нагрузки. В качестве контроля использовали животных, содержащихся в обычных земных условиях.

Получение синапсосом. Синапсосомы выделяли дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности фиколла-400, применяя метод Котмана [4] с небольшими модификациями: раствор сахарозы для приготовления градиента фиколла содержал 5 мМ Hepes-NaOH и 0.2 мМ ЭДТА, pH 7.4. Синапсосомы, полученные при фракционировании в градиенте фиколла, разводили 10 объемами 0, 32 М сахарозы, 5 мМ Hepes-NaOH, pH 7.4 и центрифугировали с ускорением 20000g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали на льду в стандартном солевом растворе следующего состава: 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1.0 мМ NaH₂PO₄, 20 мМ Hepes, pH 7.4, 10 мМ d-глюкоза. Полученную суспензию синапсосом (концентрация белка 4 мг/мл) использовали в экспериментах в течение 2—4 ч после получения. Ca²⁺-содержащая среда состояла из стандартного солевого раствора и 2 мМ CaCl₂. Бескальциевая среда не содержала кальция, в нее добавляли 1 мМ ЭГТА. Все процедуры проводили при температуре 4 °С. Концентрацию белка определяли способом, описанным в работе [10].

Определение освобождения ГАМК и L-глутамата. Для определения уровня освобождения [³H]ГАМК и L-[¹⁴C]глутамата из синапсосом, суспензию (концентрация белка 4 мг/мл) в стандартном Ca²⁺-содержащем буфере преинкубировали 10 мин при $t = 37$ °С, затем добавляли 50 нМ [³H]ГАМК или 500 нМ L-[¹⁴C]глутамата и инкубировали еще 10 мин при $t = 37$ °С. После инкубирования с [³H]ГАМК и L-[¹⁴C]глутаматом суспензию разводили 10 объемами охлажденного стандартного солевого раствора, центрифугировали 10 мин с ускорением 4000g, затем осадок ресуспендировали в том же буфере при температуре 0 °С и использовали в эксперименте (концентрация белка 4 мг/мл). Суспензию синапсосом разводили стандартным Ca²⁺-содержащим буфером до концентрации белка 1 мг/мл. Освобождение [³H]ГАМК и L-[¹⁴C]глутамата осуществляли следующим образом: образцы (120 мкл; 25—30 мкг нагруженных синапсосом) преинкубировали 10 мин при $t = 37$ °С, добавляли деполяризующий реагент, инкубировали

6 мин и быстро осаждали в микроцентрифуге (20 с при 10000g). Аликвоты надосадка (90 мкл) и растворенного в SDS осадка смешивали со сцинтилляционной жидкостью ACS (1.5 мл) и определяли радиоактивность с помощью счетчика радиоактивности Tracor Analytic DELTA 300.

Уровень освобождения нейромедиатора выражали долей от общего содержания меченого нейромедиатора.

В экспериментах были использованы фиколл-400 (Serva), Hepes (Sigma), ЭДТА (Calbiochem), d-глюкоза (Sigma), L-глутамат (Sigma), L-[^{14}C]глутамат (Amersham), SDS (Fluka), NaCl, KCl, MgCl_2 , NaNH_2PO_4 , CaCl_2 (о. с. ч. Реахим), сцинтилляционная жидкость ASC (Amersham).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали проведенные эксперименты, в результате воздействия моделированной гравитации базальное, нестимулированное освобождение нейромедиаторов [^3H]ГАМК и L-[^{14}C]глутамата из изолированных нервных окончаний не претерпевает каких-либо достоверных изменений независимо от наличия Ca^{2+} во внеклеточной среде. Так как уровень базального освобождения отражает состояние плазматической мембраны, можно полагать, что гравитационная нагрузка не приводит к изменению проницаемости плазматической мембраны.

Результатом деполяризации плазматической мембраны изолированных нервных окончаний является освобождение нейромедиаторов. Наличие или отсутствие Ca^{2+} во внеклеточной среде при деполяризации плазматической мембраны является определяющим условием того, какой механизм освобождения нейромедиаторов из синапсом реализуется. При наличии Ca^{2+} активируется процесс экзоцитоза, слияние синаптических везикул с плазматической мембраной, в отсутствие Ca^{2+} процесс освобождения нейромедиаторов является Na^+ -зависимым и происходит посредством реверсного функционирования транспортеров нейромедиаторов, локализованных в плазматической мембране. Для определения Ca^{2+} -зависимого освобождения необходимо из величины, полученной в Ca^{2+} -содержащей среде, вычесть величину, полученную в бескальциевой среде, так как определенный вклад процесса Na^+ -зависимого освобождения имеет место и при наличии Ca^{2+} .

На рис. 1 представлена зависимость процесса освобождения глутамата из синапсом от времени при деполяризации синапсом высокой концентрацией KCl (35 мМ), либо блокатром K^+ -каналов 4-аминопиридином (4-АП) при наличии Ca^{2+} . Как видно, процесс освобождения нейромедиатора сна-

чала прогрессивно ускоряется, а затем замедляется в течение первых нескольких минут деполяризации. Во всех дальнейших экспериментах количество освобожденного медиатора определяли за 6 мин стимуляции. Все данные приведены за вычетом базального освобождения, т. е. характеризуют только уровень стимулированного освобождения.

Было исследовано освобождение [^3H]ГАМК и L-[^{14}C]глутамата из синапсом при деполяризации плазматической мембраны 35 мМ хлористым калием в бескальциевой среде, в условиях активации Na^+ -зависимого механизма освобождения нейромедиаторов. Экспериментальные данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что после пребывания животных в условиях моделированной гипергравитации статистически достоверных изменений в величинах Ca^{2+} -независимого освобождения нейромедиаторов не наблюдалось. В контроле эти значения составляли $15.74 \pm 1.22\%$ общего содержания метки в синапсосах для [^3H]ГАМК и $7.7 \pm 2.8\%$ для L-[^{14}C]глутамата, а после гипергравитационной нагрузки — $13.1 \pm 1.6\%$ и $12.9 \pm 2.0\%$ соответственно за 6 мин стимуляции. Можно предположить тенденцию к увеличению цитоплазматического пула глутамата в условиях моделированной гравитации. Не исключено, что увеличивается количество транспортеров глутамата в плазматической мембране нервных окончаний или изменяется число транспортеров нейромедиаторов, работающих в обратном режиме.

Для того чтобы охарактеризовать Ca^{2+} -зависимое освобождение нейромедиаторов, деполяризацию плазматической мембраны нервных окончаний вызывали разными агентами. 4-АР вызывает исключительно зависимое от кальция освобождение ГАМК, тогда как при деполяризации высокими

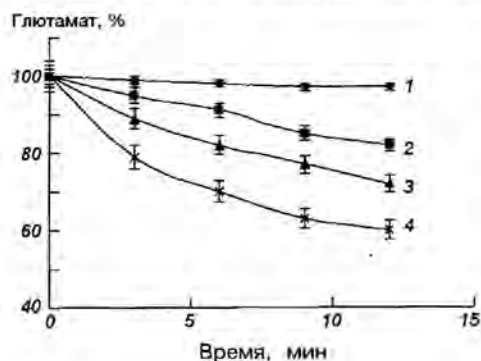


Рис. 1. Зависимость освобождения глутамата (в процентах от общего содержания метки в препарате) из синапсом от времени в Ca^{2+} -содержащей среде: 1 — освобождение глутамата не тестируется при 4 °C; 2 — базальное нестимулированное освобождение после 10 мин прединкубации при 37 °C; 3 — стимулированное 4-АР (конечная концентрация 2 мМ); 4 — стимулированное KCl (конечная концентрация 35 мМ)

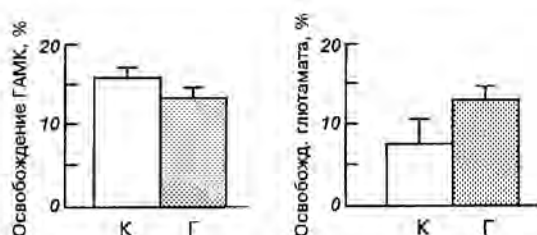


Рис. 2. Ca^{2+} -независимое, стимулированное КС1 освобождение ГАМК и глутамата из синапсом контрольных животных (К) и животных после гипергравитационной нагрузки (Г) по результатам трех независимых экспериментов

концентрациями хлористого калия в условиях кальциевой среды вклад натрий-зависимого освобождения практически равен по величине освобождению, зависимому от кальция (рис. 3). В отличие от ГАМК, при деполяризации плазматической мембраны 4-АР в кальций-содержащей среде, освобождение глутамата из синапсом происходило как посредством активации процесса экзоцитоза, так и обращения работы глутаматных транспортеров. При исследовании освобождения ГАМК использовали 4-АР, а для работы с глутаматом применяли хлористый калий.

Экзоцитоз — это молекулярный механизм, включающий вход кальция и освобождение нейромедиаторов. Изначально предполагалось, что неспецифический вход кальция является сигналом, стимулирующим секрецию нейромедиаторов. Современные гипотезы базируются на том, что не вход кальция, а его концентрация в специфических частях клетки, возможно имеющих отношение к локализации кальциевых каналов, ответственна за секрецию. Полагают, что ионные каналы не существуют как изолированные функциональные единицы, а ассоциированы с различными белками, имеющими отношение к причаливанию синаптических везикул, и формируют активную зону регуляции экзоцитоза [12]. Авторами показана существование взаимосвязь между освобождением нейромедиаторов-аминокислот и кальциевыми каналами, вовлеченными в этот процесс, кроме того, показано, что тип деполяризующего агента, открывающего канал, также играет важную роль при освобождении нейромедиаторов. Например, высокая концентрация хлористого калия приводит к входу кальция через P/Q-, N- и L-типы кальциевых каналов, а 4-АР вовлекает в процесс только P/Q- и N-типы. При этом в освобождение такого нейромедиатора как ГАМК, стимулированное 4-аминопиридином, вовлечен только P/Q-тип.

Настоящим исследованием показано, что кальций-зависимое, стимулированное 4-АР (конечная

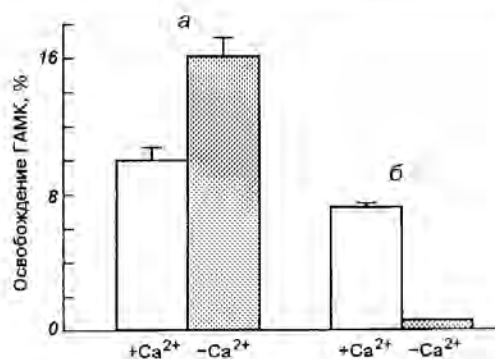


Рис. 3. Ca^{2+} -зависимое (+) и Ca^{2+} -независимое (-) освобождение [³H]ГАМК из синапсом головного мозга крыс: а — стимулирующий агент КС1 (конечная концентрация 50 мМ), б — 4-АП (конечная концентрация 2 мМ) по результатам трех независимых экспериментов

концентрация 2 мМ) освобождение [³H]ГАМК из синапсом было значительно больше у экспериментальных животных, которые подвергались воздействию моделированной гравитации, чем контрольных. Величина кальций-зависимого компонента составляла $11.74 \pm 1.2\%$ общего содержания метки в синапсом за 6 мин стимуляции, тогда как в контроле — $7.2 \pm 0.54\%$ (рис. 4).

Исследовано освобождение L-[¹⁴C]глутамата из синапсом при деполяризации плазматической мембраны 35 мМ хлористым калием в Ca^{2+} -содержащей среде. Как указывалось выше, значение Ca^{2+} -зависимого освобождения может быть получено путем вычитания величины освобождения в бескальциевой среде из данных, полученных при деполяризации в Ca^{2+} -содержащей среде. Пребывание животных в условиях моделированной гипергравитации вызывало уменьшение кальций-зависимого освобождения глутамата от $14.4 \pm 0.7\%$ в контроле до $6.2 \pm 1.9\%$ от общего содержания метки в препарате (рис. 4).

Нами впервые было показано, что гипергравитационный стресс влияет на процесс освобождения ГАМК и глутамата. Сравнительный анализ Ca^{2+} -зависимого освобождения ГАМК и глутамата показал, что пребывание животных в условиях моделированной гравитации вызывает противоположные изменения в передаче тормозных и возбуждающих сигналов. Как видно из вышеизложенного, после гипергравитационной нагрузки количество ГАМК, освобождающееся из нервных окончаний путем экзоцитоза, увеличивается, а глутамата — уменьшается. Изменения, которые наблюдались в стимулированном деполяризацией кальций-зависимом освобождении нейромедиаторов, коррелируют с нашими данными относительно активности транспор-

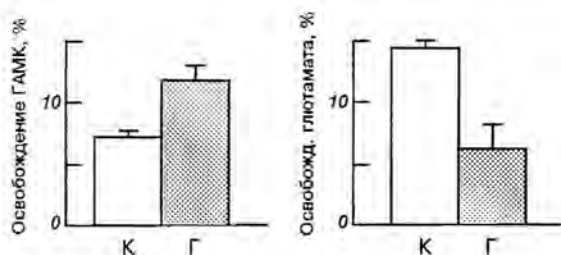


Рис. 4. Ca^{2+} -зависимое, стимулированное 4-АП и КС1, освобождение ГАМК и глутамата из синапсом контрольных животных (К) и животных после гипергравитационной нагрузки (Г) по результатам трех независимых экспериментов

теров ГАМК и глутамата плазматической мембраны нервных окончаний [1–3]. Не исключено, что при воздействии гипергравитации, сопровождающейся развитием гипоксии мозга, модуляция функционирования транспортеров нейромедиаторов и процесса экзоцитоза в нервных окончаниях происходит посредством общих регуляторных механизмов.

Наши данные коррелируют с результатами Neurolab Spacelab Mission NASA [16], где было показано, что во время космического полета и после него, наблюдается значительные изменения в синаптических белках Synaptophysin и SNAP-25. В условиях гипергравитации также происходят изменения в морфологии синапса. Кроме того, ранее было показано, что микротрубочки — чрезвычайно гравитационно-чувствительная клеточная структура, которая модулируется в условиях измененной гравитации. Известно, что Synaptophysin, SNAP-25, микротрубочки являются неотъемлемой составляющей транспорта синаптических везикул к месту их локализации и процесса экзоцитоза.

Наши исследования позволяют оценить биохимические составляющие синаптической пластичности.

1. Borisova T. A., Krisanova N. V., Himmelreich N. H. Artificial gravity and functional plasticity of nerve system L-[^{14}C]-glutamate uptake by nerve terminals from rat cerebellum and cerebral hemispheres under hypergravity stress // *J. Grav. Physiol.*—2002.—9 (1).—P. 25—P26.
2. Borisova T., Krisanova N., Himmelreich N. Na^+ -dependent glutamate efflux from rat brain synaptosomes under extremal condition // *J. Grav. Physiol.*—2003.—10 (1).—P. 43—44.
3. Borisova T. A., Krisanova N. V., Himmelreich N. H. Exposure of animals to artificial gravity conditions leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals // *Adv. Space Res.*—2004.—33 (8).—P. 1362—1367.
4. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol.*—1974.—31.—P. 445—452.
5. Gegelashvili G., Schousboe A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity // *Mol. Pharmacol.*—1997.—52.—P. 6—15.

6. Gonzales M., Robinson M. Neurotransmitter transporters: why dance with so many partners? // *Curr. Opin. in Pharmacol.*—2004.—4.—P. 30—35.
7. Guillaume A. I., Osmont D., Gaffie D., et al. Physiological implications of mechanical effects of +Gz accelerations on brain structures // *Aviat. Space and Environ. Med.*—2002.—73 (3).—P. 171—177.
8. Jabaudon D., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y., et al. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 8733—8738.
9. Jensen J. B., Pickering D. S., Schousboe A. Depolarization-induced release of [^3H]D-aspartate from GABAergic neurons caused by reversal of glutamate transporters // *Int. J. Dev. Neurosci.*—2000.—18.—P. 309—315.
10. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.*—1986.—155.—P. 243—248.
11. Levi G., Raiteri M. Carrier-mediated release of neurotransmitters // *Trends Neurosci.*—1993.—16.—P. 415—419.
12. Lopez E., Oset-gasque M., Figueroa S., et al. Calcium Channel types involved in intrinsic amino acid neurotransmitters release evoked by depolarizing agents in cortical neurons // *Neurochemistry International.*—2001.—39.—P. 283—290.
13. Sanford G. L., Harris-Hooker S., Lui J., et al. Influence of changes in gravity on the response of lung and vascular cells to ischemia/reperfusion in vitro // *J. Grav. Physiol.*—1999.—6 (1).—P. 27—8.
14. Shahed A. R., Son M., Lee J. C., Werchan P. M. Expression of c-fos, c-jun and HSP70 mRNA in rat brain following high acceleration stress // *J. Grav. Physiol.*—1996.—3 (1).—P. 49—56.
15. Sun X. Q., Zhang L. F., Wu X. Y., Jiang S. Z. Effect of repeated +Gz exposures on energy metabolism and some ion contents in brain tissues of rats // *Aviat. Space and Environ. Med.*—2001.—72 (5).—P. 422—426.
16. The Neurolab Spacelab Mission: Neuroscience Research in Space // NASA SP.—2003.
17. Vizi E. S. Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system // *Pharmacol. Revs.*—2000.—52 (1).—P. 63—89.

GABA AND GLUTAMATE: EXOSYTOSIS AND Na^+ -DEPENDENT RELEASE FROM THE RAT BRAIN NERVE TERMINALS UNDER EXTREMAL CONDITIONS

T. A. Borisova, N. G. Pozdnyakova, N. B. Krisanova, N. G. Himmelreich

It is demonstrated for the first time that hypergravity stress affects nerve signal transmission, in particular, the release of GABA (the most common inhibitory neurotransmitter) and L-[^{14}C]glutamate (predominant excitatory neurotransmitter). A comparative analysis of release of GABA and glutamate from the rat brain synaptosomes (nerve terminals) shows that exposure of animals to hypergravity loading (10G for 1 hour) evokes oppositely directed alterations in inhibitory and excitatory signal transmission. Significant changes occurred in release of neurotransmitters induced by stimulating exocytosis with the agents, which depolarized nerve terminal plasma membrane. Depolarization-evoked Ca^{2+} -stimulated release was more abundant for GABA ($7.2 \pm 0.54\%$ and $11.74 \pm 1.2\%$ of total accumulated label for control and hypergravity, respectively, ($P \leq 0.05$)) and was essentially less for glutamate ($14.4 \pm 0.7\%$ and $6.2 \pm 1.9\%$, ($P \leq 0.05$)) after exposure of animals to centrifuge induced artificial gravity.