

УДК 57.045:576.33

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

Институт біохімії ім. А. В. Палладіна Національної академії наук України, Київ

Влияние DL-трео- β -бензилоксиаспартата (DL-ТВОА) на освобождение глутамата из синапсом в среде с низким содержанием внеклеточного Na^+ в норме и в условиях моделированной гравитации

Доповідь на конференції 05.09.05

Вивчено вплив інгібітора натрій-залежного транспорту глутамату на процес вивільнення L-[^{14}C]глутамату нервовими закінченнями великих півкуль мозку щурів за умов модельованої гравітації. Встановлено, що внаслідок гравітаційного навантаження зростає ефективність дії несубстратного конкурентного інгібітора DL-трео- β -бензилоксиаспартату (DL-ТВОА) на процес стимульованого деполяризацією вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових закінчень у середовищі з низьким вмістом натрію.

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что длительное пребывание в условиях измененной гравитации приводит к нарушению функционирования центральной нервной системы [1, 3, 4, 6, 8]. В центральной нервной системе млекопитающих L-глутамату присущи нейромедиаторные функции. Взаимодействие L-глутамата со специфическими рецепторами обеспечивает передачу возбуждающих сигналов. Освобождение нейромедиатора из пресинаптической терминали, ведущее к повышению его концентрации в синаптической щели и активации специфических рецепторов, является ключевым этапом процесса нейротрансмиссии. Как показано недавними исследованиями, значительная часть освобождаемого глутамата имеет невезикулярное происхождение, т. е. нейромедиатор попадает во внеклеточное пространство не посредством Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза [5, 7]. При этом освобождение нейромедиатора является Ca^{2+} -независимым процессом и происходит в результате функционирования мембран-

ных специфических транспортеров глутамата в реверсном режиме. Обычно работа транспортеров направлена на поддержание концентрации нейромедиатора в синаптической щели на низком уровне, т. е. на перенос глутамата из синаптической щели внутрь клетки. Термодинамически реверсному функционированию транспортеров способствует низкое содержание АТФ внутри клетки, увеличение концентрации внеклеточного калия и уменьшение внеклеточного натрия.

Ингибиторы модулируют процесс транспорта глутамата, и следовательно, чрезвычайно важны для детального изучения фармакологической специфичности и функциональной роли глутаматных транспортеров. DL-трео- β -бензилоксиаспартат (DL-ТВОА) является новым эффективным нетранспортируемым конкурентным ингибитором транспортеров глутамата. Целью настоящего исследования было изучение влияния ингибитора DL-ТВОА и Na^+ на процесс кальций-независимого освобождения L-[^{14}C]глутамата из

нервных окончаний головного мозга крыс (синапсом) в условиях моделированной гравитации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Получение синапсом. Синапсомы выделяли дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности фикола-400, применяя метод Котмана с небольшими модификациями: раствор сахарозы для приготовления градиента фикола содержал 5 мМ Hepes-NaOH и 0.2 мМ ЭДТА, pH 7.4 [2]. Синапсомы, полученные при фракционировании в градиенте фикола, разводили 10 объемами 0.32 М сахарозы, 5 мМ Hepes-NaOH, pH 7.4 и центрифугировали при ускорении 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 синапсом (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 $t = 4$ °С. Концентрацию белка определяли по способу [9].

Определение освобождения L-глутамата. Для определения освобождения L-[¹⁴C]глутамата из синапсом суспензию (концентрация белка 4 мг/мл) в стандартном Ca²⁺-содержащем буфере преинкубировали 10 мин при $t = 37$ °С, затем добавляли 500 нМ L-[¹⁴C]глутамата и инкубировали еще 10 мин при $t = 37$ °С. После инкубирования L-[¹⁴C]глутаматом суспензию разводили 10 объемами охлажденного стандартного солевого раствора, центрифугировали 10 мин при

ускорении 4000g, затем осадок ресуспендировали в том же буфере при температуре 0 °С и использовали в эксперименте (концентрация белка 4 мг/мл). Суспензию синапсом разводили стандартным Ca²⁺-содержащим буфером до концентрации 1 мг белка/мл. Освобождение L-[¹⁴C]глутамата осуществляли следующим образом: образцы (120 мкл; 25—30 мкг нагруженных синапсом) преинкубировали 10 мин при $t = 37$ °С, добавляли деполяризующий реагент, инкубировали 6 мин и быстро осаждали в микроцентрифуге (20 с при ускорении 10000g). Аликвоты надосадка (90 мкл) 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 фикола-400 (Serva), Hepes (Sigma), ЭДТА (Calbiochem), d-глюкоза (Sigma), L-глутамат (Sigma), L-[¹⁴C]глутамат (Amersham), SDS (Fluka), NaCl, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, CaCl₂ (о.с.ч. Реахим), сцинтилляционная жидкость ASC и OSC (Amersham).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение концентрации внеклеточного натрия вызывает уменьшение накопления L-[¹⁴C]глутамата нервными окончаниями и термодинамически способствует реверсному функционированию транспортеров. Мы использовали одновалентный органический катион N-метил-D-глюкамин (NMDG), чтобы заменить внеклеточный натрий, полагая, что такие условия проведения эксперимента позволят нам глубже исследовать процесс освобождения L-[¹⁴C]глутамата из цитозольного пула синапсом. Необходимо отметить, что синапсомы обладают характеристиками интактного нервного окончания-мембранным потенциалом, способностью к активному накоплению и освобождению нейромедиаторов при деполяризации плазматической мембраны.

Сначала мы оценили уровень базального освобождения L-[¹⁴C]глутамата в натрийсодержащей (126 мМ [Na⁺]) и NMDG-содержащей (62 мМ [Na⁺]) бескальциевых средах за 6 мин инкуба-

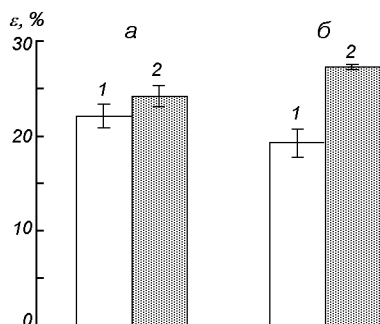


Рис. 1. Уровень ϵ базального освобождения L-[^{14}C]глутамата из синапсом в натрий- и NMDG-содержащих средах (1 и 2): а — в нормальных условиях, б — после воздействия моделированной гравитации ($P \leq 0.05$)

ции в препаратах синапсом, полученных из контрольных животных, и животных после воздействия моделированной гравитации. Уровень базального освобождения в среде с NMDG по отношению к натрийсодержащей составил $110 \pm 4\%$ и $140 \pm 2\%$ у контрольных и опытных животных различие достоверно с уровнем значимости $P \leq 0.05$ (рис. 1). Возможно, после гипергравитационной нагрузки увеличивалось количество нейромедиатора в цитозольном пуле с последующим освобождением L-[^{14}C]глутамата через транспортеры, функционирующие в реверсном режиме. Не исключено также, что изменения величины натриевого градиента в синапсом, возникающие в условиях гравитационной нагрузки, усиливаются в условиях снижения внеклеточного натрия.

Необходимо отметить, что при наличии Ca^{2+} в среде инкубации активируется процесс экзоцитоза, слияние синаптических везикул с плазматической мембраной, а при отсутствии Ca^{2+} процесс освобождения нейромедиаторов является Na^+ -зависимым, и происходит посредством реверсного функционирования транспортеров нейромедиаторов, локализованных в плазматической мембране. Влияние DL-TBOA изучали при деполяризации плазматической мембраны 35 мМ хлористым калием в бескальциевых средах с разным содержанием ионов натрия за 6 мин инкубации. DL-TBOA проявляет ингибиторный эффект, который усиливается с увеличением его концентрации в среде. Сравнительный анализ данных показал, что 10 мкМ DL-TBOA уменьшает кальций-независимое освобождение

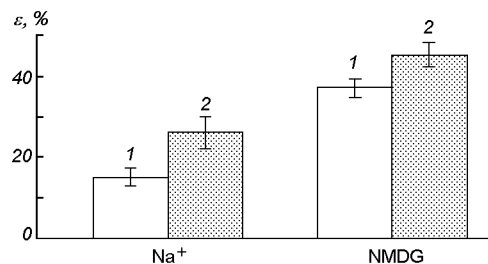


Рис. 2. Ингибиторный эффект 10 мкМ DL-TBOA на кальций-независимое освобождение L-[^{14}C]глутамата из синапсом в натрий- и NMDG-содержащих средах в норме (1) и после воздействия моделированной гравитации (2)

L-[^{14}C]глутамата в натрийсодержащей среде на $15.2 \pm 2.2\%$ в контрольных экспериментах и $26.2 \pm 3.9\%$ после влияния моделированной гравитации ($P \leq 0.05$). В NMDG-содержащей — $37.0 \pm 2.3\%$ и $45.0 \pm 3.0\%$, соответственно ($P \leq 0.05$) (рис. 2). В натрийсодержащей среде 100 мкМ DL-TBOA снижает кальций-независимое освобождение L-[^{14}C]глутамата на $44.0 \pm 3.0\%$ в норме и на $50.4 \pm 4.0\%$ после воздействия моделированной гравитации. В NMDG-содержащей — $84.0 \pm 5.0\%$ как в норме, так и после гравитационной нагрузки.

Таким образом, в результате воздействия гравитационной нагрузки мембранные транспортеры глутамата нервных окончаний головного мозга, обеспечивающие активное удаление L-[^{14}C]глутамата из синаптической щели, становятся более чувствительными к действию несубстратного конкурентного ингибитора глутаматных транспортеров DL-TBOA как в натрийсодержащей, так и в NMDG-содержащей средах. Изложенные выше экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что как в норме, так и в условиях моделированной гравитации ингибирующее действие DL-TBOA на освобождение L-[^{14}C]глутамата усиливается в NMDG-содержащей среде, способствующей реверсному функционированию транспортеров.

1. 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.—P. 1362—1367.
2. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // Methods Enzymol.—1974.—31.—P. 445—452.

3. D'Amelio F., Fox R. A., Wu L. C., et al. Quantitative changes of GABA-immunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension // *J. Neurosci Res.*—1996.—**44**, N 6.—P. 532—539.
4. D'Amelio F., Wu L. C., Fox R. A., Hypergravity exposure decreases gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in axon terminals contacting pyramidal cells in the rat somatosensory cortex: a quantitative immunocytochemical image analysis // *J. Neurosci Res.*—1998.—**15**, N 53.—P. 135—142.
5. Danbolt N. C. Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.*—2001.—**65**.—P. 1—105.
6. Fox R. A. Effects of artificial gravity: central nervous system neurochemical studies // *NASA Taskbook.*—1997.—P. 619—620.
7. Gegelashvili G., Schousboe A. cellular distribution and kinetic properties of affinity glutamate transporters // *Brain Res. Bull.*—1998.—**45**, N 3.—P. 233—238.
8. Hughes-Fulford M. Altered cell function in microgravity // *Exp. Gerontol.*—1991.—**26**, N 2-3.—P. 247—256.
9. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant

enhancement of the Lowry method for protein determination // *Analytical Biochemistry.*—1986.—**155**.—P. 243—248.

THE EFFECTS OF DL-THREO- β -BENZYLOXY-ASPARTATE (DL-TBOA) ON THE SYNAPTOSOMAL GLUTAMATE RELEASE IN MEDIA LOW IN [Na⁺] UNDER ARTIFICIAL GRAVITY

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

L-glutamate release from cytosolic pool of brain synaptosomes after exposure of rats to artificial gravity loading was investigated using the inhibitor of glutamate transport as a tool. The nontransportable competitive inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) was demonstrated to become more potent in Na⁺ and NMDG-supplemented media under centrifuge-induced hypergravity. We showed that DL-TBOA inhibited L-[¹⁴C]glutamate release effectively in NMDG-supplemented media in comparison with Na⁺-supplemented one.