

Т. А. Борисова, Л. А. Касаткина

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, Київ
e-mail: tborisov@biochem.kiev.ua

Тромбоциты как потенциальный периферический маркер для анализа функционирования высокоаффинных Na^+ -зависимых транспортеров глутамата в нервных окончаниях головного мозга

Надійшла до редакції 26.10.06

Показано, що в умовах модельованої гравітації змінюється активність високоафінних Na^+ -залежних глутаматних транспортерів плазматичної мембрани нервових закінчень. Проведено порівняльний аналіз транспорту $\text{L-}[^{14}\text{C}]$ глутамату в тромбоцитах крові та ізольованих нервових закінченнях головного мозку. Визначено кінетичні характеристики транспортерів, досліджено вплив позаклітинного $[\text{Na}^+]$ і конкурентного інгібітора DL-трео-бета-гідроксиаспартату на процес накопичення $\text{L-}[^{14}\text{C}]$ глутамату тромбоцитами і нервовими закінченнями. Показано, що значення V_{max} процесу накопичення значно менші у препараті тромбоцитів ніж у нервових закінченнях. Очевидно, це пов'язано з тим, що плазматична мембрана синапсом містить більшу кількість транспортерів глутамату, ніж мембрана тромбоцитів. У цілому процес накопичення глутамату тромбоцитами і синапсомами демонстрував значну подібність, і тромбоцити можна використовувати як потенційну периферичну модель транспорту глутамату в ЦНС.

Тромбоциты — форменные элементы крови, которые чрезвычайно важны для процесса ее свертывания. Они способны к агрегации (слипанию) и благодаря адсорбции удерживают на своей поверхности факторы свертывания крови. Эти свойства обуславливают активное участие тромбоцитов в свертывании крови. Тромбоциты представляют собой плоские безъядерные фрагменты клеток неправильной формы длиной 1—4 мкм и толщиной 0.5—0.75 мкм. Они образуются в красном костном мозге в результате фрагментации мегакариоцитов. Мегакариоцит — результат дифференцировки стволовой клетки крови в красном костном мозге. При действии гормона тромбопоэтина мегакариоцит отщепляет до 1000 фрагментов цитоплазмы-тром-

боцитов. Отсутствие у тромбоцитов клеточного ядра не дает возможности синтезировать ДНК и ограничивает их способность к синтезу белков *de novo*. Тромбоциты, как «безъядерные клетки», не являются клетками в классическом смысле [6].

Активация тромбоцитов АДФ, тромбином или в результате адгезии приводит к изменению их формы. В неактивированном состоянии тромбоциты имеют типичную дисковидную форму. На поверхности активированного тромбоцита выпячиваются многочисленные псевдоподии, способные прикрепляться к различным поверхностям. Тромбоцит расплывается и может даже перемещаться на небольшие расстояния. Гранулы, содержащиеся в центральной части цитоплазмы,

при активации тромбоцита сливаются с наружной мембраной и секретируют свое содержимое в кровь или тканевую жидкость. При этом активные вещества, вышедшие из гранул, действуют на белки крови, стимулируя дальнейшее тромбообразование, после чего тромбоцит погибает [6].

В центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих L-глутаминовая кислота способна действовать как основного возбуждающего нейромедиатора, так и потенциального нейротоксина. Известно, что содержание этой аминокислоты вне клетки строго контролируется быстрым удалением ее из синаптической щели. Поглощение глутамата из синаптической щели осуществляется высокоаффинными натрий-зависимыми транспортерами глутамата, которые локализованы в плазматической мембране пресинаптических нервных окончаний и используют электрохимический градиент $N\ddot{a}/K^+$ как движущую силу. По-видимому, транспортеры выполняют сложные функции модуляции нейротрансмиссии.

Известно, что при нарушениях регуляции концентрации глутамата в синаптической щели возникает хроническое возбуждение нейрона. Глутаматэргическая сверхстимуляция может разрушать нейроны. Причиной глутаматной нейротоксичности является связывание глутамата с его рецепторами, результатом чего является значительное, массивное увеличение концентрации цитоплазматического кальция. Нарушения, возникающие в процессе как поглощения, так и освобождения глутамата, могут быть вовлечены в патогенез нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, шизофрения, эпилепсия и др. При мозговых травмах и ишемии наблюдаются нарушения трансмиссии глутамата [5, 7].

Одной из причин нарушений, происходящих в центральной нервной системе животных в условиях моделированной гравитации, считается изменение функционирования глутаматных транспортеров. На изолированных нервных окончаниях (синапсосомах) головного мозга крыс показано, что в условиях моделированной гравитации изменяется активность процесса транспорта глутамата [1—3].

Многие нарушения в ЦНС характеризуются запоздалым появлением симптомов болезни. Ди-

агностика в этой области базируется в основном на клинических симптомах, так как невозможно проанализировать ткань мозга во время жизни пациента. В связи с этим поиск периферического маркера для анализа состояния глутаматных транспортеров мозга является актуальной задачей современной биохимии. Эта проблема остается нерешенной в течение длительного времени. Многие клетки и ткани обладают способностью к накоплению глутамата. Высокоаффинное натрий-зависимое накопление было зафиксировано в эритроцитах, тромбоцитах, в мышечной ткани, простате, печени, почках, плаценте, костной ткани, легких [5]. Несомненный интерес представляет изучение транспорта глутамата в клетках крови в связи с возможностью провести полную и своевременную диагностику у пациента.

В настоящее время тромбоциты интенсивно изучаются как модель синаптического аппарата, так как они обладают способностью накапливать и освобождать такие нейромедиаторы как серотонин и дофамин, экспрессировать серотониновые и глутаматные рецепторы. Тромбоциты были предложены как модель ЦНС для изучения изменений белка предшественника амилоида. Показано, что тромбоциты крови способны аккумулировать глутамат [9]. Недавно обнаружено, что тромбоциты содержат высокоаффинные натрий-зависимые транспортеры глутамата, сходные с транспортерами, локализованными в плазматической мембране нейронов и глиальных клеток мозга. Эту тему развивает настоящее исследование, в котором изучается в сравнении функционирование глутаматных транспортеров в тромбоцитах крови и изолированных нервных окончаниях мозга. Исследование накопления глутамата тромбоцитами также представляет несомненный интерес с точки зрения выяснения роли цитозольного пула глутамата, который появляется в результате работы транспортеров по переносу глутамата из внеклеточного во внутриклеточное пространство. Анализ процесса накопления глутамата тромбоцитами, как моделью транспорта глутамата в мозгу, является чрезвычайно важной и актуальной задачей современной биохимии с перспективами дальнейших разработок в области космической биологии, биотехнологии и клинического применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение синапсом. В опыте использовали половозрелых самцов крыс Wistar, весом 100—120 г. Синапсомы из больших полушарий головного мозга крыс 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. Синапсомы, полученные при фракционировании в градиенте фиколла, разводили 10 объемами 0.32 М сахарозы, 5 мМ Hepes-NaOH, pH 7.4 и центрифугировали при 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 4 °С. Концентрацию белка определяли, как описано в работе [8].

Накопление L-глутамата синапсомы.

При определении активного накопления L-глутамата суспензию синапсом (из расчета 250 мкл суспензии на каждое измерение, концентрация белка 250 мкг/мл) преинкубировали 10 мин при 37 °С в стандартном Ca²⁺-содержащем буфере. Затем добавляли смесь немеченного L-глутамата и меченного радиоактивной меткой L-[¹⁴C]глутамата (251 мКи/ммоль) в разных соотношениях. Аликвоты суспензии синапсом (250 мкл, 63 мкг белка) отбирали через различные промежутки времени (15, 45 с) и фильтровали на фильтрах Whatman GF/C (Англия). Фильтры быстро промывали охлажденным солевым раствором, помещали на 1 час во флаконы со 100 мкл 10 % SDS и измеряли радиоактивность в сцинтилляционной жидкости OCS (объем пробы 1.5 мл) на счетчике радиоактивности Tracor Analytic DELTA 300. Количество поглощенного глутамата определяли, используя данные по активности меченого препарата. Неспецифическое связывание глутамата измеряли

путем инкубирования с синапсомы L-[¹⁴C]глутамата при 4 °С.

Получение тромбоцитов. Кровь из ушной вены кролика (примерно 20 мл) собирали в пластиковые пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Далее проводили выделение как описано в работе [9] с небольшими модификациями.

Накопление L-глутамата тромбоцитами.

При изучении активного накопления L-глутамата тромбоциты преинкубировали 15 мин при 37 °С в стандартном бескальциевом буфере. Затем добавляли смесь немеченного L-глутамата и меченного радиоактивной меткой L-[¹⁴C]глутамата (251 мКи/ммоль). Аликвоты суспензии тромбоцитов отбирали через различные промежутки времени от 0 до 50 мин и быстро осаждали в микроцентрифуге (20 с при 10000 g). Аликвоты надосадка (90 мкл) смешивали со сцинтилляционной жидкостью ACS (1.5 мл) и определяли радиоактивность с помощью счетчика радиоактивности Tracor Analytic DELTA 300. Полученный осадок промывали дважды стандартным солевым буфером. Радиоактивность осадка определяли аналогично. Количество поглощенного глутамата определяли, используя данные по активности меченого препарата. Неспецифическое связывание глутамата измеряли сразу после добавления L-[¹⁴C]глутамата.

В экспериментах были использованы фиколла-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

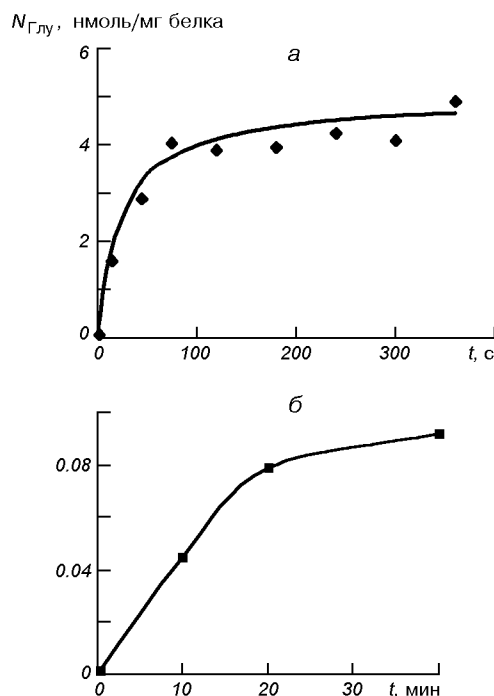
Недавно нами была разработана модельная система по изучению влияния искусственной гравитации на процесс синаптической передачи. Исследования, проведенные на изолированных нервных окончаниях (синапсомы) мозга крыс показали, что искусственная гравитация существенно влияет на активность глутаматных транспортеров [1—3]. В связи с полученными экспериментальными данными поиск и разработка потенциального периферического маркера

для анализа активности глутаматных транспортеров в мозге является чрезвычайно актуальной задачей в области современной биохимии и представляет несомненный интерес с точки зрения космической биологии, медицины и биотехнологии.

Целью настоящего исследования было провести сравнительный анализ процесса высокоаффинного натрий-зависимого транспорта глутамата в изолированных нервных окончаниях головного мозга и тромбоцитах крови. Исследования были проведены на фракции синапсом (отделенные от аксонов нервные окончания) головного мозга крыс и препарате тромбоцитов, полученных из крови кролика. Синапсомы обладают всеми характеристиками интактного нервного окончания: мембранным потенциалом, способностью к активному накоплению нейромедиаторов и освобождению нейромедиаторов при деполяризации мембраны. Для исследования процесса высокоаффинного натрий-зависимого накопления глутамата синапсомы и тромбоциты инкубировали с L-[^{14}C]глутаматом / L-глутаматом. Количество $N_{\text{Глу}}$ поглощенного глутамата определяли, используя данные по активности (251 мКи/ммоль) меченого препарата.

На рисунке показано количество $N_{\text{Глу}}$ поглощенного L-[^{14}C]глутамата препаратами синапсом (а) и тромбоцитов (б). Видно, что зависимость количества поглощенного глутамата от времени инкубации существенно отличалась в обоих исследованных препаратах. Для синапсом график зависимости имел прямолинейный участок во временном интервале до 45 с, а к 3 мин выходит на плато. В то же время для тромбоцитов линейная зависимость наблюдалась во временном интервале до 20 мин. Необходимо отметить, что количество поглощенного L-[^{14}C]глутамата тромбоцитами за 20 мин инкубации значительно ниже, чем синапсомами за 30 с.

Для определения кинетических характеристик (K_m и V_{max}) поглощения глутамата синапсомы и тромбоциты инкубировали с L-[^{14}C]глутаматом / L-глутаматом в различных концентрациях. Был выбран диапазон концентраций L-глутамата от 5 до 100 мкмоль. Данные, полученные при инкубации синапсом с возрастающими концентрациями L-[^{14}C]глутамата/L-глутамата, позволили установить гиперболическую зависи-



Зависимость накопления L-[^{14}C]глутамата (10 мкМ) синапсомами (а) и тромбоцитами (б) от времени инкубации

мость начальной скорости поглощения от концентрации глутамата. Определение величины кажущейся K_m по данным измерения начальной скорости процесса накопления при различных концентрациях глутамата проводили методом двойных обратных величин Лайнуивера — Бэрка. K_m для синапсом составила 10.7 ± 2.5 мкМ. Максимальная скорость процесса накопления (V_{max}) для синапсом составила 12.5 ± 3.2 нмоль/мин/мг белка. Тем же методом были определены кинетические характеристики процесса накопления L-[^{14}C]глутамата тромбоцитами. Величина K_m составила 36 ± 8 мкМ, а V_{max} — 5.2 ± 1.3 пмоль/мин/мг белка. Большая разница в значении V_{max} связана, по-видимому, с гораздо меньшим количеством глутаматных транспортеров, экспрессированных на мембране тромбоцитов по сравнению с плазматической мембраной нервных окончаний.

Движущей силой процесса накопления глутамата высокоаффинными транспортерами плазматической мембраны является Na^+/K^+ электрохимический градиент плазматической мемб-

раны. Предполагают, что натрий необходим для связывания глутамата с транспортером, а калий — для процесса переноса. В целом процесс является электрогенным. Зависимость накопления от внеклеточного Na^+ является одной из основных характеристик высокоаффинных транспортеров плазматической мембраны. Снижение концентрации внеклеточного натрия вызывает уменьшение накопления L-[^{14}C]глутамата и термодинамически способствует реверсному функционированию транспортеров. Был проведен сравнительный анализ процесса накопления L-[^{14}C]глутамата синапсосомами и тромбоцитами в условиях низкого содержания натрия в инкубационной среде. Для замены внеклеточного натрия был использован одновалентный органический катион N-метил-D-глуксамин (NMDG). Уменьшение концентрации Na^+ в среде инкубации в два раза с 126 мМ до 63 мМ приводило к снижению накопления L-[^{14}C]глутамата (10 мкМ) нервными окончаниями на $42 \pm 5\%$ и тромбоцитами на $45 \pm 5\%$. Дальнейшее снижение концентрации внеклеточного Na^+ до 21 мМ уменьшало накопление на $75 \pm 8\%$ и $73 \pm 8\%$ в синапсосомах и тромбоцитах соответственно. При расчетах накопление в стандартном растворе инкубации, где содержание Na^+ составляло 126 мМ, принимали за 100%. Экспериментальные данные свидетельствуют, что процесс накопления L-[^{14}C]глутамата являлся в одинаковой степени натрий-зависимым для обоих исследованных препаратов.

Ингибиторы модулируют процесс транспорта глутамата и, следовательно, чрезвычайно важны для детального изучения фармакологической специфичности, активности и функциональной роли глутаматных транспортеров. Постоянно идет синтез новых аналогов глутамата, их изучение и поиск среди них потенциальных фармакологических агентов, способных модулировать процесс синаптической передачи. Однако, несмотря на значительные усилия исследователей, для клинического применения до сих пор не найдено вещество, способное изменять работу глутаматных транспортеров. DL-трео-бета-гидроксиаспартат (DL-ТНА) является эффективным транспортируемым конкурентным ингибитором транспортеров глутамата. Был проведен сравнительный анализ влияния этого субстратного ингибитора на процесс накопления L-

[^{14}C]глутамата нервными окончаниями и тромбоцитами. Показано, что наличие 10 мкМ DL-ТНА в среде инкубации снижало накопление L-[^{14}C]глутамата синапсосомами на $73 \pm 5\%$, 100 мкМ DL-ТНА — на $85 \pm 5\%$ (концентрация глутамата в среде составляла 10 мкМ). Влияние ингибитора на накопление L-[^{14}C]глутамата тромбоцитами существенно не отличалось от экспериментальных данных, полученных на нервных окончаниях. 10 мкМ DL-ТНА ингибировал накопление в тромбоцитах на $60 \pm 5\%$, 100 мкМ DL-ТНА — на $90 \pm 5\%$ (концентрация глутамата в среде инкубации составляла 10 мкМ).

В нервных окончаниях глутамат из цитозольного пула, который является результатом функционирования транспортеров по переносу глутамата из внеклеточного во внутриклеточное пространство, аккумулируется в синаптических везикулах, которые в дальнейшем, при стимуляции, освобождают свое содержимое в синаптическую щель при слиянии с плазматической мембраной путем экзоцитоза. Тромбоциты также содержат гранулы с активными веществами, стимулирующими тромбообразование, одним из механизмов секреции которых является экзоцитоз. Таким образом, цитозольный глутамат в тромбоцитах, в отличие от синапсосом, не подлежит дальнейшей аккумуляции и хранению в специализированных везикулах. Этим, по-видимому, определяется гораздо меньшая активность транспортного процесса глутамата в тромбоцитах по сравнению с нервными окончаниями.

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что нейромедиатор в нервном окончании распределен между двумя пулами — везикулярным и цитоплазматическим. Как показано недавними исследованиями в нервных окончаниях значительная часть освобождаемого глутамата имеет невезикулярное происхождение, т. е. происходит из цитозольного пула [5, 7]. При этом освобождение нейромедиатора является Ca^{2+} -независимым процессом и происходит в результате функционирования мембранных транспортеров глутамата в реверсном режиме. Термодинамически реверсному функционированию транспортеров способствует низкое содержание АТФ внутри клетки, увеличение концентрации внеклеточного калия и уменьшение внеклеточного натрия. Результатом деполяризации плазматиче-

ской мембраны изолированных нервных окончаний является освобождение нейромедиаторов. Наличие или отсутствие Ca^{2+} во внеклеточной среде при деполяризации плазматической мембраны является определяющим условием того, из какого пула (везикулярного или цитоплазматического) происходит освобождение нейромедиаторов. При наличии Ca^{2+} активируется процесс экзоцитоза, слияния 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. Роль транспорта глутамата во внутриклеточное пространство тромбоцитов и накопленного в цитозоле глутамата в настоящий момент четко не определена.

В целом процесс накопления глутамата тромбоцитами и синапсами демонстрирует значительное сходство, о чем свидетельствуют приведенные выше экспериментальные данные. Аффинность транспортеров к субстрату близка для обоих препаратов. Незначительная разница может быть объяснена различным соотношением типов транспортеров, экспрессированных на мембране тромбоцитов и нервных окончаний. (На настоящий момент клонировано 5 типов высокоаффинных транспортеров глутамата с разной тканевой специфичностью и несколько отличающимися между собой кинетическими характеристиками, а именно значением кажущейся K_m). Продемонстрировано значительное различие максимальных скоростей транспортного процесса для нервных окончаний и тромбоцитов. Это различие связано, по-видимому, с тем, что плазматическая мембрана синапсом содержит гораздо большее количество транспортеров глутамата по сравнению с мембраной тромбоцитов. Влияние ингибитора DL-ТНА на накопление $\text{L-}^{14}\text{C}$ глутамата тромбоцитами существенно не отличается от данных, полученных на нервных окончаниях.

Таким образом, тромбоциты можно рассматривать как потенциальный периферический маркер для анализа функционирования высокоаффинных глутаматных транспортеров в мозге. Несомненно, эта актуальная и важная тема требует проведения дальнейших исследований. Одним из направлений работы может быть при-

менение искусственной гравитации как модельной системы для изучения корреляции изменений кинетических характеристик глутаматных транспортеров мозга с возможными изменениями характеристик транспортного процесса глутамата в тромбоцитах.

1. Borisova T. A., Himmelreich N. H. Centrifuge-Induced Hypergravity: ^3H GABA and $\text{L-}^{14}\text{C}$ glutamate Uptake, Exocytosis and Efflux Mediated by High-Affinity, Sodium-Dependent Transporters // *Adv. Space Res.*—2005.—36.—P. 1340—1345.
2. Borisova T. et al., Comparison of DL-threo- β -benzyloxyaspartate effects on the glutamate release from synaptosomes before and after exposure of rats to artificial gravity // *J. Gravit. Physiol.*—2005.—12.—P. 23—24.
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.—P. 1362—1367.
4. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol.*—1974.—31.—P. 445—452.
5. Danbolt N. C. Glutamate uptake // *Progr. Neurobiol.*—2001.—65.—P. 1—105.
6. Gawaz M. Blood platelets. — Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag Book, 2001.—300 p.
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. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Analytical Biochemistry.*—1986.—155.—P. 243—248.
9. Mangano R., Schwarcz R. The human platelets as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate // *J. Neurochemistry.*—1981.—36 (3)—P. 1067—1076.

PLATELETS AS POTENTIAL PERIPHERAL MARKERS TO STUDY FUNCTIONING OF THE HIGH-AFFINITY SODIUM-DEPENDENT GLUTAMATE TRANSPORTERS IN THE NERVE TERMINALS OF THE BRAIN

T. A. Borisova, L. A. Kasatkina

Activity of the high-affinity sodium-dependent glutamate transporters in the brain nerve terminals is demonstrated to alter under artificial gravity conditions. A comparison analysis is made for $\text{L-}^{14}\text{C}$ glutamate transport in platelets and isolated nerve terminals. The kinetic characteristics of the transporters, $[\text{Na}^+]$ -dependence and influence of the transporter inhibitor DL-threo- β -benzyloxyaspartate on the $\text{L-}^{14}\text{C}$ glutamate uptake process are determined. It is shown that glutamate uptake process is very similar for platelets and nerve terminals. Thus it is reasonable to use platelets as a potential peripheral model for glutamate transport.