

УДК 577.45:577.24

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЫСОКОАФФИННОГО ЗАХВАТА
L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ СИНАПТОСОМАМИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

КНАРЯН В. А., АПРИКЯН Г. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван

Изучены возрастные изменения кинетических параметров высокоаффинного захвата L-аспарагиновой кислоты (Асп) синапсосомами головного мозга белых крыс. Показано, что величина K_m уменьшается при старении на 33%, а величина V — на 44,5%. Предполагается, что повышение сродства Асп к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата носит компенсаторный характер, направленный на повышение синаптической активности Асп в старости. Изучение роли Na^+ в синапсосомном захвате Асп при старении показало, что при концентрациях Na^+ ниже физиологической скорость захвата Асп уменьшается у животных обоих возрастов. Установлено, что N-ацетил-L-аспарагиновая кислота (НААсп) ингибирует синапсосомный захват Асп и L-глутаминовой кислоты (Глу) у молодых и старых животных в одинаковой степени, что позволяет рассматривать НААсп в качестве перспективного регулятора синаптической активности Асп и Глу, особенно в старческом возрасте.

Одной из важнейших задач современной нейробиологии, и в частности нейрохимии, является изучение особенностей процесса передачи нервного импульса при старении и возможностей его регуляции физиологически активными веществами. За последние годы значительно возрос интерес к изучению различных сторон синаптической активности нейромедиаторных аминокислот (НМА) — их высвобождению из нервных окончаний, взаимодействию с соответствующими рецепторами и обезвреживанию посредством высокоаффинного захвата.

Известно, что Глу и Асп выполняют функцию возбуждающих медиаторов в ЦНС, а ГАМК — тормозящего [1]. Вслед за высвобождением медиаторов из нервных окончаний в синаптическую щель и их взаимодействием с соответствующими постсинаптическими рецепторами происходит инактивация медиаторов. Наиболее эффективным средством терминации синаптического действия НМА является их высокоаффинный Na^+ -зависимый захват [2]. Высокоаффинная система захвата НМА показана для срезов, клеточных популяций и синапсосом головного мозга [3].

В предыдущих наших работах было показано, что интенсивность захвата НМА срезами и синапсосомами головного мозга значительно снижается при старении [4]. В литературе имеются подробные сведе-

ния относительно изменений кинетических параметров синапсомного захвата Глу и ГАМК при старении [5, 6].

Целью настоящего исследования явился кинетический анализ синапсомного захвата Асп при старении. Проведено также сравнительное изучение влияния Na^+ и нейроспецифического соединения НААсп на захват Асп синапсами головного мозга молодых и старых белых крыс.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах (самках) популяции *Wistar* двух возрастных групп: молодые (3—6-месячные) и старые (24—26-месячные). Животных декапитировали, извлекали головной мозг, на холоде освобождали большие полушария от мозжечка и ствола и помещали в холодный раствор 0,32 М сахарозы. Синапсомы получали по методу Hajos [7]. Конечный осадок синапсом суспендировали в 0,32 М сахарозе.

Для определения захвата [^{14}C] Асп 0,1 мл синапсомной суспензии (эквивалентной 100 мкг белка) инкубировали в 0,9 мл смеси, содержащей модифицированный буфер Кребса-Генселяйта, [^{14}C] Асп в концентрациях $0,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , $2 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ М и АОУК (10^{-5} М) в качестве ингибитора трансаминирования. Состав модифицированного буфера Кребса-Генселяйта (в мМ): трис- HCl буфер, рН 7,4—25, NaCl —127,2, KCl —5, CaCl_2 —2,7, MgSO_4 —1,3, глюкоза—11,1 [8].

Пробы ингибировали в атмосфере воздуха при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера. Фракции осаждали центрифугированием при 4000 об/мин на К-23 (ГДР) в течение 15 мин при 4° , надосадочную жидкость отделяли, осадок промывали 3 мл холодного буфера, высушивали, растворяли диметилсульфоксидом и добавляли 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея. Для определения радиоактивности в среде поглощения из каждой пробы брали 0,025 мл надосадочной жидкости. Радиоактивность измеряли на жидкостном спектрометре Inter technique SL-4221 (Франция). Скорость захвата аминокислоты выражали в нмоль [^{14}C] Асп/мг белка фракции/5 мин.

При приготовлении Na -дефицитной среды NaCl замещали эквивалентным количеством трис- HCl буфера. Использовали NaCl в концентрациях 19; 27; 43; 80 и 127,2 мМ и [^{14}C] Асп в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М.

При изучении влияния НААсп на захват Асп и Глу инкубационная среда содержала [^{14}C] Асп ($0,35 \cdot 10^{-6}$ М) или [^{14}C] Глу ($0,5 \cdot 10^{-6}$ М), немеченую аминокислоту (10^{-5} М) и НААсп (10^{-3} М). Степень захвата аминокислот выражали отношением числа распадов/мин/мг осадка фракции к числу распадов/мин/мкл среды поглощения.

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [9] в модификации

Hess, Lewin [10]. Обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Фишера-Стьюдента [11].

В работе использованы Трис (гидроксиаминометан), Асп, Глу, NAAсп (чистота 99,82%) и АОУК («Sigma», США). Использованы L-[U- ^{14}C] Асп с удельной радиоактивностью 140 мКи/ммоль (Чехословакия) и L-[U- ^{14}C] Глу с удельной радиоактивностью 200 мКи/ммоль (Чехословакия).

Результаты и обсуждение

Изучение захвата ^{14}C Асп синапсами при старении показало, что скорость его при всех выбранных нами концентрациях субстрата заметно отстает у старых животных (рис. 1). Разница в скорости захвата ^{14}C Асп у молодых и старых животных увеличивается

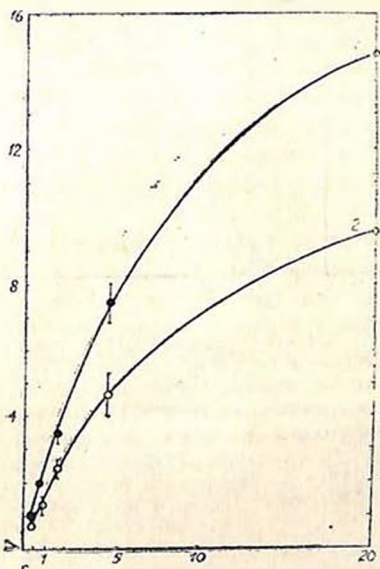


Рис. 1. Зависимость скорости захвата ^{14}C Асп (V , нмоль ^{14}C Асп/мг белка/5 мин) синапсами головного мозга от концентрации субстрата (S , мкМ) у молодых (1) и старых (2) белых крыс. По оси абсцисс — концентрация ^{14}C Асп (0,5, 1, 2, 5 и 20) в мкМ.

по мере увеличения концентрации субстрата в инкубационной среде. Так, при концентрации ^{14}C Асп $0,5 \times 10^{-6}$ М скорость захвата у старых животных меньше, чем у молодых на 22,9%, а при концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М — на 35,3%.

Определение кажущихся величин K_m и V захвата ^{14}C Асп синапсами при старении методом двойных обратных величин (рис. 2) показало, что с возрастом кинетические параметры захвата ^{14}C Асп изменяются. Величина V захвата ^{14}C Асп синапсами у молодых

животных составляет 20, а у старых—11,1 нмоль/мг белка/мин, т. е. величина V снижается с возрастом на 44,5%. Полученные нами результаты можно сравнить с данными, полученными Wheeler [6], согласно которым величины V захвата Глу и ГАМК синапсами головного мозга 30-месячных крыс меньше, чем 2-месячных соответственно на 28 и 14%.

Величина K_m синаптического захвата [^{14}C] Асп изменяется с возрастом, составляя у молодых животных 10, а у старых—6,7 мкМ, то

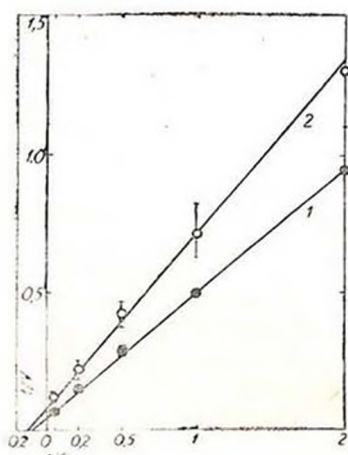


Рис. 2. Зависимость скорости захвата [^{14}C] Асп синапсами головного мозга от концентрации субстрата у молодых (1) и старых (2) белых крыс в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка

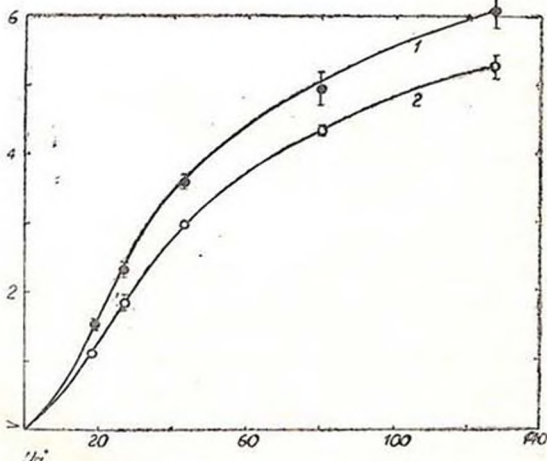


Рис. 3. Зависимость скорости захвата [^{14}C] Асп (V , нмоль [^{14}C] Асп/мг белка/5 мин) синапсами головного мозга от концентрации Na^+ (мМ) у молодых (1) и старых (2) белых крыс. Инкубационная среда содержала [^{14}C] Асп в концентрации 5 мкМ и Na^+ в концентрациях 19, 27, 43, 80 и 127,2 мМ.

есть величина K_m с возрастом уменьшается на 33%. Таким образом, при старении возрастает сродство субстрата к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата. Для сравнения отметим, что величины K_m захвата ГК и ГАМК синапсами головного мозга крыс уменьшаются при старении соответственно на 10 и 8% [5, 6].

Таким образом, полученные нами данные об изменении кинетических параметров захвата Асп аналогичны результатам исследований Wheeler относительно захвата Глу и ГАМК и позволяют предположить, что при старении повышение сродства НМА к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата носит компенсаторный характер, направленный на продление постсинаптического действия НМА на фоне их низкого уровня в старости.

Высокоаффинный захват НМА является энергозависимым процессом. Энергия, утилизируемая при транспорте НМА обеспечивается комбинированием натриевого ($[Na^+]_o > [Na^+]_i$) и калиевого ($[K^+]_i > [K^+]_o$) концентрационных градиентов [12]. Показано, что с каждой молекулой Асп, Глу или ГАМК, поступающей из синаптической щели в нервные окончания транспортируются два Na^+ [5, 6, 12, 13, 14]. Изучена роль Na^+ в синаптическом захвате Глу и ГАМК как у молодых, так и у старых животных и показано, что при концентрациях Na^+ ниже физиологической, скорость захвата Глу и ГАМК уменьшается у животных обеих возрастных групп [5, 6].

В связи с вышесказанным нам представлялось интересным изучить зависимость скорости захвата $[^{14}C]$ Асп от Na^+ синаптическими головного мозга белых крыс при старении. Результаты этих исследований представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что скорость захвата $[^{14}C]$ Асп синаптическими головного мозга молодых животных падает по мере уменьшения концентрации Na^+ в инкубационной среде. Аналогичная зависимость наблюдается и в случае захвата $[^{14}C]$ Асп синаптическими головного мозга старых животных.

Зависимость захвата $[^{14}C]$ Асп от концентрации Na^+ у обеих возрастных групп описывается одинаковыми кривыми сигмовидного характера.

Скорость захвата $[^{14}C]$ Асп у старых животных отстает от скорости захвата у молодых при всех выбранных концентрациях Na^+ , хотя по мере увеличения Na^+ в среде разница эта уменьшается.

Ранее нами было показано, что нейроспецифическое соединение НААсп ингибирует нейронный, глутеральный и синаптический захват Асп, а также синаптический захват Глу у животных молодого возраста [15]. Синаптический захват тормозящего медиатора ГАМК под влиянием НААсп существенных изменений не претерпевал. Эти данные позволили сделать вывод об участии НААсп в процессе синаптической передачи, осуществляемой возбуждающими НМА Асп и Глу на стадии термации их действия в условиях *in vitro*.

Об участии НААсп в синаптических процессах свидетельствуют также литературные данные. Так, показано, что НААсп связывается с гидрофобной протеолипидной фракцией из коры мозга крыс, специфически связывающей Асп и Глу, а также ингибирует связывание Асп той же фракцией [16]. Гекчан и Априкьяном [17] установлено, что НААсп заметно стимулирует высвобождение Асп и Глу из синапсом головного мозга как молодых, так и старых белых крыс, но не влияет на высвобождение ГАМК.

С целью изучения возможностей регуляции высокоаффинного захвата НМА в старческом возрасте нами было проведено сравнительное исследование влияния НААсп на захват Асп и Глу синаптическими головного мозга при старении. Проведенные исследования показали, что НААсп подавляет захват Асп синаптическими у молодых и старых животных соответственно на 54,7 и 54,8%, а захват Глу—соответствен-

но на 34,1 и 30,6% (таблица). Из полученных данных видно, что ингибирующее действие НААсп на захват Асп и Глу синапсосомами проявляется одинаково у животных обеих возрастных групп.

Т а б л и ц а

Захват L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот синапсосомами головного мозга белых крыс при старении (распад/мин/мг фракции на распад/мин/мкл среды). Влияние N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты

Возраст животных	Асп		Глу	
	контроль	НААсп	контроль	НААсп
Молодые	38.63 ± 5.24 (20)	$41.15 \pm 2.87^*$ (20)	98.9 ± 3.9 (16)	$65.2 \pm 3.2^*$ (16)
Старые	60.21 ± 4.66 (20)	$27.2 \pm 2.3^*$ (20)	74.4 ± 4.2 (16)	$52.4 \pm 3.5^*$ (16)

Примечание. * $p < 0,001$ по отношению к контролю.

Следует отметить, что полученные в этих экспериментах данные о снижении интенсивности синапсосомного захвата Асп и Глу при старении, составляющие соответственно 32,2 и 24,7%, согласуются с результатами, полученными ранее в нашей лаборатории [4].

Таким образом, как показали наши исследования, НААсп является перспективным соединением для направленного регулирования синаптического действия возбуждающих НМА, особенно в старческом возрасте.

KINETIC ANALYSIS OF HIGH AFFINITY L-ASPARTIC ACID UPTAKE BY RAT BRAIN SYNAPTOSOMES DURING AGING

KNARYAN V. A., APRIKYAN G. V.

Buniatian Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

We studied the high-affinity uptake of L-aspartic acid (Asp) by synaptosomes from aged (24—36 months old) rats as compared with synaptosomes isolated from young (3—6 months old) animals. K_m decreased by 33% and V_{max} by 44.5% with aging. We suggest that the increased affinity of Asp to a hypothetical carrier at a relatively low uptake rate is a compensatory response of the nervous system leading to stabilization of the synaptic function in old animals. Both in young and old rats the uptake of Asp by brain synaptosomes was dependent on the presence of Na^+ in the medium. N-acetyl-L-aspartic acid inhibited the high-affinity uptake of Asp and Glutamate by brain synaptosomes from either young or old rats.

1. *Curtis D. R., Johnston G. A. R. Ergebn. Physiol.*, v. 69, p. 94—188, 1974.
2. *Iversen L. L. Brit. J. Pharmacol.*, v. 41, № 4, p. 571—591, 1971.
3. *Fagg G. F., Foster A. C. Neuroscience*, v. 9, № 4, p. 701—719, 1983.
4. *Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Кнарян В. А., Ахвердян Э. С. Физиол. журн. СССР*, т. 30, № 1, с. 69—73, 1984.
5. *Wheeler D. D. Exp. Gerontol.*, v. 15, № 4, p. 269—284, 1980.
6. *Wheeler D. D. Exp. Gerontol.*, v. 17, № 1, p. 71—85, 1982.
7. *Hajos F. Brain Res.*, v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
8. *Wheeler D. D. J. Neurochem.*, v. 33, № 4, p. 883—894, 1979.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
10. *Hess H. H., Lewin E. J. Neurochem.*, v. 12, № 3, p. 205—211, 1965.
11. *Ойвин Н. А. Патол. физиология и эксперим. терапия*, т. 4, с. 76—85, 1960.
12. *Erecinska M., Wantorsky D., Wilson D. F. J. Biol. Chem.*, v. 258, № 15, p. 9069—9077, 1983.
13. *Stallcup W. B., Bulloch K., Baetge E. E. J. Neurochem.*, v. 32, № 1, p. 57—65, 1979.
14. *Martin D. L., Smith A. A. J. Neurochem.*, v. 19, № 3, p. 841—855, 1972.
15. *Априкян Г. В., Кнарян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С. Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 71—76, 1987.
16. *Burgal M., Lisondo J., Jordá A., Grissolia S. Neurochem. Res.*, v. 9, № 2, p. 219—224, 1984.
17. *Гекчян К. Г., Априкян Г. В. Тезисы докл. 10-й всесоюз. конф. по биохимии нервной системы: «Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине»*, с. 179—180, Горький, 1987.

Поступила 29. VI. 1990