



УДК 577.352.46

ВЛИЯНИЕ Met-ЭНКЕФАЛИНА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ЗАХВАТ ГЛУТАМАТА В СТРИАТУМЕ КРЫСЫ

ГОДУХИН О. В., ЖАРИКОВ С. И., БУДАНЦЕВ А. Ю.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Методом локальной суперфузии неостриатума мозга крысы обнаружено, что Met-энкефалин оказывает ингибирующее влияние на стимулированное K^+ высвобождение предварительно захваченного $[^{14}C]$ глютамата. Ингибирующее действие Met-энкефалина частично опосредовано налоксончувствительными рецепторами опиоидных пептидов и не проявляется в присутствии блокатора проведения нервного импульса тетраказина. Met-энкефалин не влиял на Na^+ -зависимый активный захват $[^3H]$ глютамата синапсами стриатума. Обсуждается механизм, с помощью которого опиоидный пептид влияет на высвобождение глютамата в стриатуме мозга крысы.

Важным аспектом в изучении функции энкефалинов является поиск принципов, посредством которых они регулируют активность нейронами нейротрансмиттерной специфичности в центральной и периферической НС животных. Известно, например, что энкефалины ингибируют высвобождение норадреналина [1], дофамина [2] и АХ [3], выполняя, таким образом, функцию пресинаптических регуляторов высвобождения нейротрансмиттеров из окончаний соответствующих нейронов. Однако не ясно, оказывают ли они ингибирующее действие на высвобождение всех нейротрансмиттеров или же только на высвобождение катехоламинов и АХ. В частности, в литературе до последнего времени не было изучено в опытах *in vivo* влияние энкефалинов на высвобождение глютамата—одного из важнейших нейротрансмиттеров в мозгу.

Известно, что нейроны, проецирующиеся из фронтальной коры в неостриатум, являются глутаматергическими [4]. Кроме того, в неостриатуме обнаружены нейроны, иммунореактивные к энкефалину [5], а стимуляция стриатума приводит к высвобождению энкефалина [6]. В настоящей работе исследовали влияние Met-энкефалина на высвобождение и захват глютамата соответствующими пресинаптическими окончаниями.

Материалы и методы

Локальная суперфузия неостриатума. Для изучения влияния Met-энкефалина на высвобождение глютамата из пресинаптических оконча-

ний глутаматергических нейронов применяли методику локальной суперфузии неостриатума. В экспериментах использовали нагнетательно-отсасывающую «push-pull» канюлю, позволяющую одновременно с суперфузией регистрировать электрическую активность из суперфузируемой области. Подробно методика эксперимента описана нами ранее [4, 7]. В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой 250—300 г. В ходе предварительной операции животным стереотаксически по атласу Фифковой и Маршала вживляли направляющие трубки с регистрирующими макроэлектродами в неостриатум по координатам $AP = -1.5$; $L = 3.1$; $V = 4.5$. Стимулирующие электроды устанавливали во фронтальной коре по координатам: $AP = -2.5$; $L = 1.5$. Через 3—4 дня после операции начинали эксперименты на наркотизированных нембуталом крысах. Через направляющую трубку в область будущей суперфузии вводили 3 мкл $[^{14}C]$ глутамата (У. А. 270 МКи/ммоль). После 20-минутного периода, необходимого для захвата экзогенного $[^{14}C]$ глутамата окончаниями глутаматергических нейронов, начинали локальную суперфузию неостриатума с помощью нагнетательно-отсасывающей канюли. Для суперфузии использовали искусственную цереброспинальную жидкость следующего состава (мМ): $NaCl - 126$; $KCl - 2.4$; $KH_2PO_4 - 0.5$; $MgSO_4 - 1.1$; $CaCl_2 - 1.1$; $NaHCO_3 - 27.5$; глюкоза—5.9. При повышении концентрации KCl в среде до 60 мМ для поддержания изотоничности среды производили эквимолярное снижение концентрации $NaCl$. pH суперфузируемого раствора доводили до 7.4 карбогенизацией среды смесью O_2/CO_2 (95%:5%). Скорость потока суперфузата составляла 40 мкл/мин. Через 60 мин после начала суперфузии производили сбор 3—4 последовательных 20-минутных фракций суперфузата. Во II и IV периоды сбора фракций в суперфузионную среду добавляли фармакологические вещества или заменяли ионный состав среды. Фракции собирали в охлажденные льдом пробирки, содержащие 200 мкл немеченого глутамата (10^{-3} М). Уровень глутамата во фракциях оценивали в процентах по отношению к его уровню в первой фракции, принятому за 100%.

Для очистки меченого глутамата от продуктов его метаболизма использовали ионообменную колоночную хроматографию [4]. Радиоактивность оценивали жидкостно-сцинтилляционным радиометрическим методом на счетчике «Interlechnique-SL-4000» (Франция).

Регистрация вызванных потенциалов. Электрическую стимуляцию фронтальной коры проводили сериями прямоугольных импульсов тока 100—200 мкА и длительностью 0.1 мс. Частота серий—0.1 Гц, длительность—1 с, частота импульсов внутри серии—70 Гц. Эксперименты с локальной суперфузией проводили лишь в том случае, если в области суперфузии регистрировались вызванные потенциалы при минимальной силе стимулирующего тока.

Na^+ -зависимый захват $[^3H]$ глутамата синапсами стриатума. Фракцию синапсом из гомогената стриатума мозга крыс-самцов массой 180—250 г выделяли с помощью центрифугирования в градиенте

плотности сахарозы по методу Hajos [8]. Фракцию синапсом ресуспендировали в 0,32 М сахарозе (HEPES—NaOH-буфер, 10 мМ, рН 7,4). Аликвоту 50 мкл суспензии синапсом, содержащей 200 мкг синаптического белка, определенного по методу Lowry, вносили в пробирки с инкубационной средой следующего состава (мМ): NaCl—132; KCl—5; MgCl₂—1,3; CaCl₂—1,2; HEPES—5; глюкоза—10 (рН доводили до 7,4 трисом и преникубировали в течение 5 мин при 37°. В конце преникубации в пробирки вносили [³H]глутамат (У. А. 21 Ки/ммоль, «Amersham», Англия), конечная концентрация которого была равна $9,5 \cdot 10^{-6}$ М. Раствор нейропептида добавляли к синапсосомам за 10 с до внесения [³H]глутамата. Конечный объем инкубационной среды после всех добавлений составлял 1 мл. Инкубация синапсом с [³H]глутаматом длилась 5 мин. Процесс захвата [³H]глутамата синапсосами останавливали методом фильтрования через мембранные фильтры «Millipore» (размер пор 0,65 мкм) на вакуумной установке при остаточном давлении 0,6—0,8 кг/см². Осадок синапсом на фильтрах промывали 3 раза по 5 мл инкубационной средой комнатной температуры. Высушенные фильтры помещали в толуольный сцинтиллятор и подсчитывали радиоактивность на счетчике «Intertechnique SL-4000» (Франция). Параллельно аналогичные эксперименты проводили в инкубационной среде, в которой NaCl был заменен эквимолярным количеством LiCl. Количество [³H]глутамата, накопившегося в синапсосах с помощью Na⁺-зависимого механизма транспорта, рассчитывали как разность между значениями, полученными в присутствии и в отсутствие Na⁺. Достоверность различия экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента.

Использованные вещества: Met-энкефалин (Tir-Gly-Gly-Phe-Met) синтезирован в ВКНЦ АМН СССР, налоксон („Du Pont Company“, США), тетракаин („Sigma“, США).

Результаты и обсуждение

Влияние Met-энкефалина на высвобождение [¹⁴C]глутамата. На рис. 1 показано, что Met-энкефалин в концентрации 10^{-6} М не оказывал достоверного влияния на спонтанное высвобождение [¹⁴C]глутамата. Наблюдалась лишь тенденция к увеличению уровня [¹⁴C]глутамата в суперфузате, особенно выраженная в III период суперфузии, когда Met-энкефалин был уже удален из среды. В отличие от спонтанного, высвобождение, вызванное высокой концентрацией K⁺ в среде, ингибировалось Met-энкефалином в концентрации 10^{-7} М (рис. 2). Изучение концентрационной зависимости ингибирующего действия Met-энкефалина (10^{-8} — 10^{-6} М) выявило оптимум при концентрации пептида 10^{-7} М (рис. 3).

Несколько иные данные по изучению влияния Met-энкефалина на высвобождение эндогенного глутамата были получены в опытах на срезах другими исследователями [9]. В этих экспериментах опиоидный пептид достоверно усиливал спонтанное высвобождение эндогенного глутамата и недостоверно ингибировал вызванное K⁺-деполяризацией (35 мМ) высвобождение этой аминокислоты.

Мы полагаем, что это различие между нашими данными, полученными в опытах *in vivo* и на срезах мозга, можно объяснить следующими причинами. Поскольку в наших экспериментах мы изучали влияние пептида на спонтанное высвобождение предварительно захваченного экзогенно введенного [14 C]глутамата, то, возможно, что его У. А. в суперфузате по сравнению с уровнем эндогенного глутамата невелика. Мы

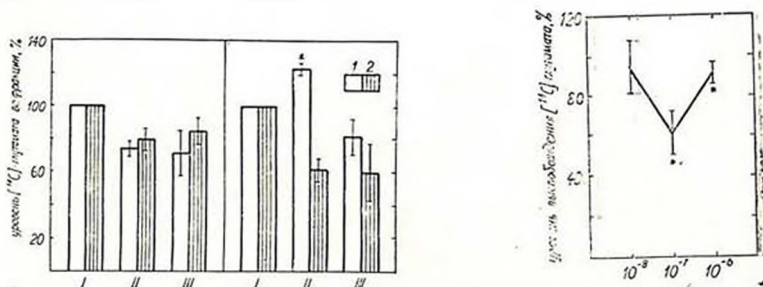


Рис. 1. Влияние Met-энкефалина на спонтанное высвобождение [14 C]глутамата: 1—уровень [14 C]глутамата во фракциях при спонтанном высвобождении; 2—во II-ой период суперфузии добавляли Met-энкефалин в концентрации 10^{-6} М. I, II, III—периоды суперфузии (то же на рис. 2)

Рис. 2. Влияние Met-энкефалина на высвобождение [14 C]глутамата, вызванное высокой концентрацией K $^{+}$ в среде: 1—уровень [14 C]глутамата во фракциях при высокой концентрации K $^{+}$ в среде во II-ом периоде суперфузии ($\uparrow$ K $^{+}$); 2—во II-ой период суперфузии в среде добавляли Met-энкефалин в концентрации 10^{-7} М; * $p < 0,05$

Рис. 3. Концентрационная зависимость ингибирующего действия Met-энкефалина на высвобождение [14 C]глутамата, вызванное K $^{+}$ -деполяризацией во II-ом периоде суперфузии. 120%—уровень высвобождения [14 C]глутамата при K $^{+}$ -деполяризации без Met-энкефалина; С (в М)—концентрация Met-энкефалина; * $p \leq 0,05$

наблюдали лишь тенденцию к увеличению уровня [14 C]глутамата в суперфузате под влиянием Met-энкефалина. С другой стороны, Met-энкефалин, по-видимому, ингибирует, в первую очередь, вызванное K $^{+}$ -деполяризацией высвобождение только что захваченного [14 C]глутамата, а не другие пулы этой аминокислоты. Поэтому в опытах с измерением высвобождения эндогенного глутамата величина У. А. только что захваченной аминокислоты невелика, и авторы наблюдали лишь тенденцию пептида ингибировать ее вызванное высвобождение. Кроме того, в опытах на срезах они использовали достаточно высокую концентрацию опиоидного пептида (10^{-6} М), тогда как наши эксперименты показали, что наиболее сильный ингибирующий эффект наблюдается при концентрации 10^{-7} М (рис. 3).

Для выяснения типа рецепторов, посредством которых в наших исследованиях Met-энкефалин оказывает ингибирующее действие на вызванное высвобождение [14 C]глутамата, одновременно с Met-энкефалином в среду добавлялся наркотик Антагонист μ -рецепторов опиоидных пеп-

тидов налоксон в концентрации $2 \cdot 10^{-7}$ М лишь частично устранял ингибирующее действие Met-энкефалина (10^{-7} М) на вызванное высвобождение [14 C]глутамата (рис. 4). Этот результат позволяет заключить, что эффект Met-энкефалина лишь частично опосредован налоксончувствительными рецепторами.

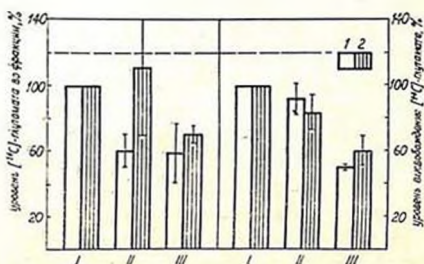


Рис. 4. Влияние налоксона на ингибирующий эффект Met-энкефалина на вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение [14 C] глутамата. 1—во II-ой период суперфузии в среду был добавлен Met-энкефалин (10^{-7} М); 2—во II-ой период в среду добавлен Met-энкефалин (10^{-7} М) и налоксон ($2 \cdot 10^{-7}$ М); штриховая линия—уровень высвобождения [14 C] глутамата при K^+ -деполяризации

Рис. 5. Влияние тетракаина на ингибирующий эффект Met-энкефалина на вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение [14 C] глутамата. 1—во II-ой период суперфузии в среду был добавлен тетракаин (10^{-4} М); 2—во II-ой период в среду добавляли тетракаин (10^{-4} М) и Met-энкефалин (10^{-7} М); штриховая линия—уровень высвобождения [14 C] глутамата при K^+ -деполяризации

Проведенные эксперименты не прояснили вопрос о том, опосредовано ли ингибирующее действие опиоидного пептида интернейронами стриатума или же обусловлено его прямым влиянием на глутаматергические пресинаптические окончания. Поэтому в отдельной серии экспериментов наряду с Met-энкефалином в среду добавляли блокатор проведения нервного импульса тетракаин (10^{-4} М). Сам по себе тетракаин снижал вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение [14 C]глутамата с 122 ± 4 до $92 \pm 11\%$. На фоне тетракаина ингибирующее действие Met-энкефалина не проявлялось (рис. 5). Возможна следующая интерпретация этих результатов: а) модуляция Met-энкефалином высвобождения глутамата опосредована через интернейроны и блокатор проведения потенциала действия по электровозбудимой мембране тетракаин снимает эффект Met-энкефалина; б) ингибирующее действие Met-энкефалина и тетракаина реализуется через один и тот же механизм (возможно, путем блокады поступления Ca^{2+} в пресинаптическое окончание), причем, в присутствии одного из этих веществ достигается «насыщение» этого механизма. Возможно сочетание обоих механизмов.

Влияние Met-энкефалина на Na^+ -зависимый захват [3H]глутамата синаптическими окончаниями. Поскольку уровень нейротрансмиттера в су-

перфузате определяется соотношением его высвобождения во внеклеточное пространство и обратным захватом в окончание, мы исследовали влияние Met-энкефалина на Na^+ -зависимый захват $[^3\text{H}]$ глутамата в синаптические окончания, выделенные из стриатума. Эксперименты показали, что пептид в концентрациях 10^{-7} — 10^{-6} М не влияет на Na^+ -зависимый захват $[^3\text{H}]$ глутамата. Количество захваченного $[^3\text{H}]$ глутамата синапсосомами в контроле и в присутствии 10^{-6} и 10^{-7} М Met-энкефалина составляло соответственно 675 ± 42 , 706 ± 37 и 642 ± 40 пмоль/мг белка/5 мин инкубации. Аналогичные результаты были получены и другими авторами в опытах на срезах стриатума [9].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что Met-энкефалин ингибирует вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение предварительно захваченного экзогенного $[^{14}\text{C}]$ глутамата в стриатуме крысы, не влияя на обратный захват этой аминокислоты в синаптические окончания. Можно предположить, что Met-энкефалин участвует в регуляции высвобождения глутамата из пресинаптических глутаматергических окончаний, так как нагнетательно-отсасывающая канюля, судя по вызванным потенциалам, была локализована в зоне максимальной активности этих окончаний.

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы показывают, что Met-энкефалин является пресинаптическим ингибитором стимулируемого высвобождения глутамата и других нейротрансмиттеров в мозгу.

EFFECT OF Met-ENKEPHALIN ON THE GLUTAMATE RELEASE AND UPTAKE IN RAT NEOSTRIATUM

GODUKHIN O. V., ZHARIKOV S. I., BUDANTSEV A. Yu.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Science,
Poustchino

Using local superfusion method with push-pull canulae has been demonstrated, that Met-enkephalin (10^{-8} — 10^{-6} M) inhibits K^+ -induced release of ^3H -glutamate preliminary accumulated in rat neostriatum. Inhibitory action of met-enkephalin is partially mediated by naloxon-sensitive opioid receptors. The effect of met-enkephalin on the release of ^3H -glutamate is not exhibited in the presence of tetracain, a blocker of potential-dependent Na-channels. Met-enkephalin (10^{-8} and 10^{-7} M) does not affect Na-dependent uptake of ^3H -glutamate by rat neostriatal synaptosomes. A possible mechanism of the influence of met-enkephalin on the release of ^3H -glutamate in rat neostriatum is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

- Mulder A. H., Schaffelmeier A. N. M.—In: Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research, v. 19, p. 273—286, N. Y., Raven Press, 1985.

2. Годухин О. В., Жариков С. И., Титов М. И., Беспалов Ж. Д., Буданцев А. Ю., Ивануцкий Г. Р. Докл. АН СССР, т. 277, № 3, с. 742—745, 1984.
3. Konishi S., Tsunoo A., Otsuka M. Nature, v. 294, № 5835, p. 80—82, 1981.
4. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Новоселов В. И. Физиол. журн. СССР, т. 65, № 10, с. 1544—1548, 1979.
5. Pickel V. M., Sumal K. K., Beckley S. C., Miller R. I., Reis D. I. J. Comp. Neurol., v. 189, p. 721—740, 1980.
6. Henderson G., Hugos G., Hosterlitz H. M. Nature, v. 271, № 5646, p. 677—679, 1978.
7. Годухин О. В., Жарикова А. Д. Физиол. журн. СССР, т. 65, с. 141—143, 1979.
8. Hajor F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
9. Arneric S. P., Mealey M. P., Reis D. I. Neurosci Lett., v. 66, p. 3—78, 1986.

Поступила 27. IV 1987

Ионы металлов в неврологии и психиатрии. Неврология и нейробиология, т. 15, Alan R. Liss, Inc., 424 с., 1985.

Metal Ions in Neurology and Psychiatry. Neurology and Neurobiology, v. 15 (Ed. S. Gabay, J. Harris and B. T. Ho), New York, USA, Alan Liss, Inc., 424 p., 1985.

Имеются убедительные доказательства того, что неврологические и психические расстройства могут в ряде случаев быть результатом дисбаланса металлов, присутствующих в организме в следовых количествах. Для установления роли ионов металлов в деятельности нервной системы в книге были использованы как клинические, так и фундаментальные подходы, способствующие установлению взаимосвязей между клиническими, химическими, биохимическими и фармакологическими аспектами проблемы.

Книга состоит из пяти разделов. В первом из них оценивается роль ионов металлов в развитии и становлении нервной системы. Рассматриваются последствия дефицита цинка, меди и марганца в перинатальном и неонатальном развитии (с акцентом на ЦНС) и функции ионов металлов в ходе развития и старения мозга. Родственные клинические аспекты изучения микроэлементов обсуждаются во втором разделе, в статьях, посвященных роли ванадия в психозах эффекта, неврологическими заболеваниями, связанным с дисбалансом магния, а также в статье, озаглавленной «Микроэлементы и дисульфурам». Третий раздел посвящен нейрохимическим вопросам и включает работы, рассматривающие влияние лития на энергетический обмен мозга, эффекты ионов металлов на нейротрансмиттерную функцию и обмен веществ, а также роль цинка в нейроэндокринологических процессах. В четвертом разделе сведены работы по нейротоксичности и невропатологии. Анализируются невропатологические эффекты ионов токсичных металлов, экспериментальная нейротоксичность свинца и возможные подходы для объяснения патологий мозга человека, связанных с нейротоксичностью марганца. Последний раздел концентрирует внимание на методологии и прикладных вопросах.

Книга предназначена для широкого круга клиницистов, работающих в области неврологии, психиатрии и фармакологии, равно как и ученых, интересующихся нейронауками, нейрохимией, биохимией и биоорганической химией.