



УДК 577.7:591.481.1:547.965

Ca²⁺-ЗАВИСИМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

АПРИКЯН Г. В., ГЕКЧЯН К. Г., ВАРТАНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследовали роль Ca²⁺ в высвобождении нейромедиаторных аминокислот из нервных окончаний головного мозга белых крыс при старении. Установлено, что K⁺-вызванное, Ca²⁺-зависимое и Ca²⁺-независимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсом значительно снижается в старческом возрасте. Удаление Ca²⁺ из среды приводит к резкому подавлению высвобождения [¹⁴C] глутаминовой кислоты (ГК), [¹⁴C] аспарагиновой кислоты (АК), [¹⁴C] ГАМК у обеих возрастных групп, причем возрастное различие в степени подавления высвобождения несущественно, хотя в старческом возрасте такое подавление происходит на сниженном фоне высвобождения.

В последние годы все больше накапливается экспериментальных данных, указывающих на то, что зависимость от Ca²⁺ является универсальной чертой любого активного секреторного процесса [1, 2]. Полагают, что существование Ca²⁺ зависимого, вызванного деполяризацией высвобождения является одним из основных свойств нейромедиаторов [3—5], а появление этого процесса вместе с поглощением высокого сродства считается показателем нейронального и, в частности, синапсомного созревания [6].

В настоящее время можно считать установленным существование двух пулов нейромедиатора: Ca²⁺-зависимого, везикулярного пула, предполагающего выделение медиатора посредством экзоцитоза, и Ca²⁺-независимого цитоплазматического пула. Выделение медиатора в этом случае связывают с мембранно-транспортными системами [7, 8]. Следует отметить, что индуцированный деполяризацией Ca²⁺-независимый выход может осуществляться всеми клеточными субфракциями (микросомной и т. д.), глией, тогда как Ca²⁺-зависимый ограничен синапсомной фракцией [7, 9, 10]. Некоторые блокаторы Ca²⁺-каналов, например, дифенилгидантоин, активно применяются в психиатрической практике. Изучение роли Ca²⁺ в высвобождении медиатора при старении способствует расширению наших знаний о молекулярных механизмах высвобождения нейромедиаторных аминокислот и открывает новые возможности регуляции этого процесса.

Ранее было показано, что высвобождение нейромедиаторных аминокислот— $[^{14}\text{C}]\text{ГК}$, $[^{14}\text{C}]\text{АК}$ и $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ из синапсом головного мозга белых крыс при старении значительно снижается [11].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния Ca^{2+} -свободной среды на высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсом головного мозга белых крыс при старении.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 4—6-месячных (молодые) и 24—36-месячных (старые) белых крысах линии *Wistar*, содержащихся на одинаковом пищевом рационе и в идентичных условиях. Животных декапитировали и на холоду извлекали головной мозг. В экспериментах использовали головной мозг без мозжечка и продолговатого мозга.

Синапсомы выделяли по методу Hajos [12]. Полученную синапсомную фракцию осторожно разбавляли 1:1 холодной водой и осаждали центрифугированием при 18000 g в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 0,32 М сахарозе. Для инкубации и перфузии использовали буфер, содержащий (в мМ): трис- HCl (рН 7,4)—35; NaCl —128; KCl —5; CaCl_2 —2,7; MgSO_4 —1,2; глюкозы—10. С целью предотвращения метаболизма $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в буфер добавляли аминоксиуксусную кислоту— $5 \cdot 10^{-4}$ М. Ca^{2+} -свободная среда содержала также 0,2 мМ ЭГТА. Высвобождение нейромедиаторных аминокислот изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [13] непосредственно после выделения синапсомной фракции (первая инкубация) и повторно после 40-минутного выдерживания при 3—4° (вторая инкубация). Синапсомную суспензию (100 мкл, содержащую 1,5—1,7 мг белка) добавляли к 2 мл буфера и инкубировали 5 мин при 37°, после чего добавляли меченую аминокислоту $[^{14}\text{C}]\text{ГК}$, $[^{14}\text{C}]\text{АК}$, $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в конечной концентрации 10^{-6} М и продолжали инкубацию еще 15 мин. Затем по 1 мл инкубационной смеси помещали в суперфузионную камеру на ДА-миллиметровые фильтры диаметром пор 0,65 мкм („Millipore Corp.“; Bedford, USA) и промывали 0,15 М NaCl . Продолжая суперфузию, устанавливали конечную скорость 1 мл/мин. Через 6—8 мин, когда устанавливалась относительно постоянная скорость выхода радиоактивности, отбирали пробы по 0,5 мл/0,5 мин. По истечении соответствующего времени к пробам и фильтру добавляли по 10 мл сцинтиллятора Брея и считали радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике „Roche Bioelectronique Kontvon“ (Франция). Величину высвобождения (f) рассчитывали как отношение радиоактивности в перфузате к ее общему количеству в данный момент в синапсомах и на фильтре. Белок определяли по Lowry и соавт. [14]. В опытах использовали $[^{14}\text{C}]$ ГК (200 мКи/ммоль), $[^{14}\text{C}]$ АК (160 мКи/ммоль) и $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ (15 мКи/ммоль) фирмы «Cherapol» (ЧССР).

Результаты и обсуждение

Имеющиеся в литературе данные о роли Ca^{2+} в процессе высвобождения нейромедиаторных аминокислот указывают на то, что удаление его из среды перфузии значительно подавляет высвобождение ГК, АК и ГАМК из нервных окончаний головного мозга различных животных в молодом возрасте [15—17]. Однако вопрос о роли Ca^{2+} в процессе высвобождения нейромедиаторов при старении до сих пор остается открытым.

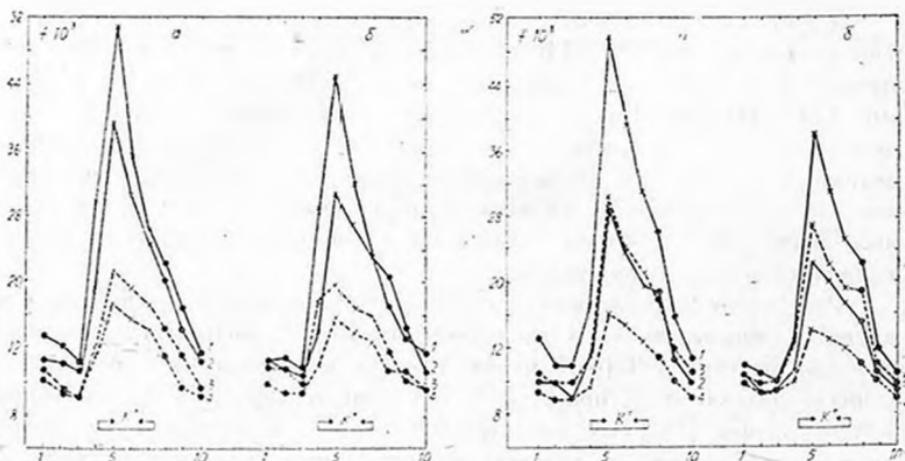


Рис. 1. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ ГК из нервных окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} (молодые животные); 2—в присутствии Ca^{2+} (старые животные); 3—в отсутствие Ca^{2+} (молодые животные); 4—в отсутствие Ca^{2+} (старые животные). Здесь и на рис. 2 и 3 приведены средние данные 4—5 опытов. Стандартные отклонения не более 10%

Рис. 2. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ АК из нервных окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} (молодые животные); 2—в присутствии Ca^{2+} (старые животные); 3—в отсутствие Ca^{2+} (молодые животные); 4—в отсутствие Ca^{2+} (старые животные)

Проведенные нами исследования показали, что высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК из синапсом головного мозга без стимуляции у старых животных несколько снижается. K^+ в концентрации 40 мМ значительно стимулирует высвобождение ГК как у молодых, так и у старых животных. Однако на пике стимуляции у старых животных высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК при первой инкубации снижается на 23,5%, а при второй—на 32% (рис. 1, а, б, кривые 1 и 2). Необходимо отметить, что в отсутствие Ca^{2+} стимулирующий эффект K^+ на высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК в обеих возрастных группах подавляется. При удалении Ca^{2+} из среды K^+ -вызванное высвобождение при первой инкубации синапсом у молодых и у старых животных подавляется соответственно на 59 и 56,4%,

а при второй—на 57 и 50%. Эти данные указывают, что в упомянутых экспериментальных условиях высвобождение [^{14}C] ГК лишь несколько снижается при старении (рис. 1, а, б). Как видно из рисунка (кривые 3 и 4) K^+ -вызванное высвобождение в отсутствие Ca^{2+} у старых животных при первой и второй инкубациях снижается соответственно на 19 и 21%. Таким образом, хотя исключение Ca^{2+} из инкубационной среды приводит почти к одинаковому подавлению высвобождения этого медиатора в обеих возрастных группах, тем не менее Ca^{2+} -независимое высвобождение значительно снижается в старости.

Другой отличительной особенностью Ca^{2+} -независимого K^+ -вызванного высвобождения [^{14}C] ГК является то, что у старых животных оно отстает от молодых в течение продолжительного времени (рис. 1, кривые 3, 4). На рис. 1 показано, что для проявления способности нервных окончаний к мгновенному высвобождению возбуждающего нейромедиатора в ответ на K^+ -вызванную деполяризацию необходимо наличие Ca^{2+} . Тем не менее, во всех случаях высвобождение ГК из нервных окончаний, особенно K^+ -вызванное высвобождение, значительно снижается в старческом возрасте.

Результаты проведенных исследований, касающиеся высвобождения другой аминокислоты—АК приведены на рис. 2. Возрастные различия в высвобождении [^{14}C] АК наиболее четко выражены на фоне резкого стимулирования этого процесса K^+ . В присутствии Ca^{2+} K^+ -вызванное высвобождение [^{14}C] АК при первой и второй инкубациях синапсом снижается в старческом возрасте соответственно на 44 и 43% (рис. 2, кривые 1, 2). При удалении Ca^{2+} из среды K^+ -вызванное высвобождение при первой инкубации синапсом у молодых и старых животных подавляется соответственно на 38 и 42,8%, а при второй—на 28,9 и 36,3%, то есть возрастные различия в степени подавления высвобождения вследствие удаления Ca^{2+} несущественны. Необходимо отметить, что Ca^{2+} -независимое K^+ -вызванное высвобождение [^{14}C] АК из свежеприготовленных синапсом и при выдерживании их при 4° у старых животных снижается на 48,2 и 48,1% (рис. 2, кривые 3, 4). Отличительной особенностью высвобождения АК по сравнению с ГК является то, что при удалении Ca^{2+} из среды инкубации K^+ -вызванное высвобождение АК подавляется значительно меньше. Более того, K^+ -вызванное Ca^{2+} -зависимое и K^+ -вызванное Ca^{2+} -независимое высвобождение [^{14}C] АК по сравнению с [^{14}C] ГК в старческом возрасте снижается более выраженно. Полученные нами результаты позволяют допустить, что механизмы высвобождения ГК и АК из синапсом отличаются друг от друга.

Изучение высвобождения [^{14}C] ГАМК—тормозящей нейромедиаторной аминокислоты из синапсом головного мозга (рис. 3, а, б) показало, что Ca^{2+} -зависимое K^+ -вызванное высвобождение при первой и второй инкубациях синапсом у старых животных снижается несколько меньше—на 15,7 и 13% соответственно (рис. 3, кривые 1, 2). При удалении Ca^{2+} из среды инкубации в указанных эксперименталь-

ных условиях высвобождение ГАМК у молодых и старых животных подавляется соответственно на 55; 56,5% и 55,8; 57,5%, то есть независимо от возраста снижается более чем на 50%. Из рис. 3 также следует, что Ca^{2+} -независимое высвобождение ГАМК снижается в свежих и выдержанных на холоду синапсосамах соответственно на 17,4 и 15% (рис. 3, кривые 3, 4).

Полученные нами результаты о высвобождении всех трех нейромедиаторных аминокислот и роли в этом процессе Ca^{2+} в молодом возрасте согласуются с литературными данными [15—17]. Установлено, что K^+ -вызванное, Ca^{2+} -зависимое и Ca^{2+} -независимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсосом значительно снижается в

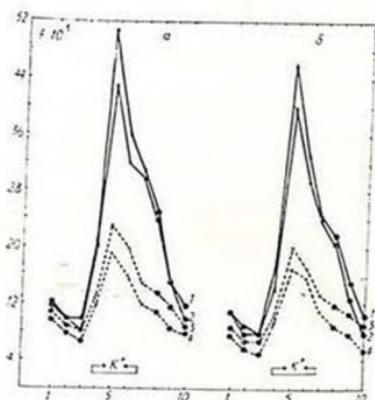


Рис. 3. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ ГАМК из первых окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} , молодые животные; 2—в присутствии Ca^{2+} , старые животные; 3—в отсутствие Ca^{2+} , молодые животные; 4—в отсутствие Ca^{2+} , старые животные

старческом возрасте. Примечательно, что удаление Ca^{2+} из среды приводит к резкому, но в одинаковой степени выраженному у молодых и старых животных подавлению этого процесса, хотя в старческом возрасте это происходит на сниженном фоне высвобождения. Можно допустить, что снижение уровня Ca^{2+} и функциональной активности Ca^{2+} -зависимых белков в старости играют важную роль в снижении высвобождения медиаторов. Нужно также иметь в виду, что в старческом возрасте уровень нейромедиаторных аминокислот значительно снижается в мозговой ткани [16], что в свою очередь может привести к снижению их высвобождения.

Ранее нами изучено высвобождение нейромедиаторных аминокислот после предварительного захвата синапсосамами, а как показали данные, полученные нами и другими исследователями [17, 19], захват нейромедиаторных аминокислот синапсосамами при старении значительно снижается.

Снижение степени высвобождения нейромедиаторных аминокислот из синапсосом головного мозга при старении в определенной степени можно объяснить изменениями, происходящими в синапсосамах в старческом возрасте [21]. Имеющиеся в литературе данные о возрастном снижении способности постсинаптических рецепторов к связыванию нейромедиаторных аминокислот [22] дают основания предположить, что

это явление и значительное снижение способности нервных окончаний к обратному захвату указанных соединений [19] служит следствием подключения компенсаторных механизмов нервной ткани, направленных на получение того же эффекта с меньшим количеством нейромедиаторов в синаптической щели вследствие снижения их высвобождения из нервных окончаний.

Ca²⁺-DEPENDENT RELEASE OF NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS FROM NERVE ENDINGS OF WHITE RATS BRAIN AT AGING

APRIKIAN G. V., GEKCHIAN K. G., VARTANIAN A. A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

The role of Ca²⁺ in the release of neurotransmitter amino acids (¹⁴C-GA, ¹⁴C-AA and ¹⁴C-GABA) on aging has been studied. It has been determined, that K⁺-induced Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent release of neurotransmitter amino acids from synaptosomes decreased considerably on aging. The extraction of Ca²⁺ from perfuse medium leads to the drastic suppression of neurotransmitters release in both age groups. There are no essential age differences in degree of release suppression, although the suppression in old rats synaptosomes occurs on the background of decreased release.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rusmusen H.* *Sciens*, v. 170, p. 404—412, 1970.
2. *Rubin R. P.* *Pharmacol. Rev.*, v. 22, p. 389—428, 1970.
3. *Blaustein M. P.* *J. Physiol. (London)*, v. 247, p. 617—655, 1975.
4. *Redburn D. A., Broome D., Ferkany J., Enna S. I.* *Brain Res.*, v. 152, p. 511—519, 1978.
5. *Sandoval M. E., Cotman C. W.* *Neuroscience*, v. 3, p. 199—206, 1978.
6. *Levi G., Guallo V., Ciotti T., Raiteri M. J.* *Neurochem.*, v. 33, № 5, p. 1043—1053, 1979.
7. *Martin D. L.*—In: *GABA in nervous system* (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 347—386, Raven Press, N.-Y., 1976.
8. *O'Fallon J. V., Brosemer R. W., Harding J. W.* *J. Neurochem.*, v. 36, № 2, p. 369—378, 1981.
9. *Levy W. B., Redburn D. A., Cotman C. W.* *Science*, v. 181, p. 676—678, 1973.
10. *Haycock J. W., Levy W. B., Denner L. A., Cotman C. W.* *J. Neurochem.*, v. 30, № 5, p. 1113—1125, 1978.
11. *Гекчян К. Г., Априкян Г. В.* *Биол. журн. Армении*, т. 40, № 9, с. 760—765, 1987.
12. *Hajos F.* *Brain Res.*, v. 3, p. 485—489, 1975.
13. *Raiteri M., Angelini F., Levi G.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 411—417, 1974.
14. *Lowry C. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. I.* *Biol. Chem.*, v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
15. *Mulder A. H., Snyder S. H.* *Brain Res.*, v. 76, p. 297—308, 1974.
16. *Reubi I. C., Cuénod N.* *Brain Res.*, v. 176, p. 185—188, 1979.

17. Nadler I. V., White W. F., Vacu K. W., Redburn D. A., Cotman C. W. J. Neurochem., v. 29, № 1, p. 279—290, 1977.
18. Weill-Fugazza J., Godefroy F. Mech. Age Dev., v. 13, № 2, p. 199—204, 1980.
19. Априкян Г. В., Шашиян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Кларян В. А., Ахвердян Э. С. Физiol. журн., т. 1, с. 69—73, 1984.
20. Wheeler D. D. Exp. Gerontology, v. 15, № 4, p. 269—284, 1980.
21. Giubi C., Bertoni-Freddary C., Piery C. Mech. Age Dev., v. 14, № 314, p. 265—271, 1980.
22. Govani S., Memo M., Saani L. Mech. Age Dev., v. 12, № 1, p. 39—45, 1980.

Поступила 2. VI 1987

Биохимия и методология рецепторов. Серийное издание (J. Wiley and Sons).

Receptor Biochemistry and Methodology. Leading Series in Biochemistry (Ed. by J. Craig Venter and Len C. Harrison), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, England.

Серия «Биохимия и методология рецепторов» посвящена достижениям молекулярной биологии в расшифровке структуры и биохимической основы деятельности рецепторов и подробному описанию необходимых методов для исследования рецепторов. Представленные в серии работы служат не только в качестве источника научной информации, но и необходимого лабораторного пособия. С 1984 по 1987 г. опубликованы следующие тома из этой серии:

т. 1. Мембраны, детергенты и солиubilизация рецепторов; т. 2. Процедура очистки рецепторов; т. 3. Молекулярная и химическая характеристика мембранных рецепторов; т. 4. Моноклональные и антиидиотипичные антитела; т. 5. Бензодиазепин/ГАМК-рецепторы и хлоридные каналы; т. 6. Перспективы классификации рецепторов гормонов; т. 7. Фосфонитриды и рецепторные механизмы.

Серия может заинтересовать исследователей в области иммунологии, биохимии, фармакологии, физиологии, биофизики, клеточной и молекулярной биологии.