

КИСЛЫЙ КОМПАРТМЕНТ И ЛАТЕНТНАЯ СИСТЕМА
АЦИДИФИКАЦИИ В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА

МЕЛЬНИК В. И., ТИТОВ С. Ю., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Изучали компартиментацию H^+ в синапсосомах мозга крыс, регистрируя изменения флуоресценции проникающего слабого основания акридиноранжа (АО) в различных средах при pH 7,4. Тушение флуоресценции АО, которое наблюдалось при добавлении синапсом и полностью обращалось протонофером или слабыми основаниями, указывает на присутствие компартамента с низким значением pH (кислого компартамента). Градиент pH, выявляемый АО, сравнительно быстро снижался при хранении синапсом на льду в солевой среде, но в сахарозной среде был достаточно устойчив. В синапсосомах, пермеабилизованных дигитонином или гипосмотическим шоком, выявлялась латентная активность АТР-зависимого H^+ -насоса, обеспечивавшая дополнительную ацидификацию. Последняя требовала присутствия хлорида и блокировалась N-этилмаленимидом. Анализ действия дигитонина показывает, что градиенты pH как в отсутствие, так и в присутствии АТР не связаны с плазмалеммой. Следовательно, кислый компартимент ограничен внутритерминальными мембранами и, вероятно, идентичен синаптическим пузырькам, в которых ранее обнаружен H^+ -насос подобного типа. Измерения латентности митохондриального H^+ -насоса показали, что у 15—25% синапсом плазмалемма повреждена (незамкнута). Не обнаружено изменений кислого компартамента при деполяризации синапсом повышением концентрации калия в среде.

Процессы метаболизма и высвобождения медиаторов в нервных окончаниях тесно связаны с поддержанием неравновесного распределения и компартиментацией ионов. Сравнительно хорошо изучены роль и механизмы поддержания градиентов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , гораздо меньше — компартиментация ионов водорода, хотя в настоящее время не может быть сомнений, что она играет важную функциональную роль. Важным элементом компартиментации H^+ служат синаптические пузырьки (СП), являющиеся местом депонирования медиаторов в нервных окончаниях. Известно, что СП характеризуются повышенной концентрацией H^+ (рН внутри около 5) [1, 2]. Функциональное значение кислой среды в СП проявляется в том, что, во-первых, активность ферментов синтеза медиаторов и процессинга нейропептидов проявляется только в слабокислой среде [3], а во-вторых, поступление медиаторов и их предшественников в пузырьки энергетически сопряжено с электрохимическим градиентом.

H^+ на мембране [4, 5]. В свою очередь, трансмембранный градиент pH в СП поддерживается за счет активного транспорта H^+ -насосом, потребляющим энергию гидролиза АТР [6, 7].

Все эти факты были установлены в опытах с изолированными везикулами [1—7] или с препаратами мембран СП [8]. Конечно, использование изолированных препаратов является обязательным этапом изучения сложной системы—нервного окончания. Но при этом есть вероятность модификации или потери некоторых регуляторных механизмов в процессе выделения, а это вызывает необходимость либо в последующей реконструкции, либо в нахождении условий, максимально приближенных к ситуации *in situ*. Последнее более реально, так как требуемые условия воспроизводятся в удобной для исследования модели—синаптических или изолированных нервных окончаниях. Более того, только на синаптических можно изучать влияние на градиенты pH таких процессов, как деполяризация и высвобождение медиаторов.

Целью настоящей работы было изучение градиентов pH , связанных с кислотами внутри компартментами, а также их локализации и механизмов поддержания в синаптических мозгах крыс. Применяемые методы не позволяют морфологически точно идентифицировать эти компартменты, поэтому мы будем употреблять термин «кислый компартмент» в широком смысле, хотя, вне сомнения, он представлен в основном синаптическими пузырьками. Исследование АТР-зависимой ацидификации, которая полностью выявляется только после пермеабиллизации синаптическим, показывает, что значительная часть синаптического имеет поврежденную (незамкнутую) плазмалемму. Предложен метод количественной оценки содержания поврежденных синаптических. Исследовали также поведение кислого компартмента при деполяризации синаптическим.

Материалы и методы

Синаптические выделяли из коры головного мозга крыс, применяя неравновесное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы по методу Najos [9]. Конечный осадок синаптическим суспендировали обычно в сахарозной среде, либо в растворе Кребса-Рингера (составы см. ниже) до концентрации 2—4 мг белка/мл (определяли методом Лоури) и держали на льду в течение опыта.

Градиенты pH измеряли с помощью флуоресцентного зонда АО, применяя метод, ранее описанный для изолированных синаптических пузырьков [7, 8]. Измерения проводили в термостатированных при 25° кюветках, содержащих 2 мкМ АО в соответствующей среде, в конечном объеме 2 мл. В качестве среды измерения использовали либо лишенный бикарбоната раствор Кребса-Рингера (состав в мМ: NaCl—132, KCl—5, NaH_2PO_4 —5, $MgCl_2$ —1,3, $CaCl_2$ —1,2, глюкоза—10, HEPES—20), либо сахарозную среду (сахароза—300, HEPES—20), либо KCl-среду (KCl—150, HEPES—20), всюду pH 7,4 при 25°. Синаптические обычно добавляли до концентрации 0,1 мг белка/мл, остальные добавки и измерения—как указано в тексте и в подписях к рисункам.

Деполаризацию синапсом в растворе Кребса-Рингера вызывали добавлением 20 мкл 3 М KCl.

Влияние АТР изучали в KCl-среде, добавляя 50 мкл 40 мМ Mg-АТР (конечная концентрация 1,0 мМ). Измеряли начальную скорость и стационарный уровень АТР-индуцированного транспорта H^+ [7, 8].

Флуоресценцию АО регистрировали в непрерывном режиме на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония), длины волн возбуждения и испускания 491 и 530 нм соответственно.

Использовали карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (Cl-CCP), N-этилмаленимид (NEM), дигитонин, сахарозу и глюкозу («Serva», ФРГ). Cl-CCP растворяли в этаноле, конечная концентрация которого в пробах не превышала 0,5%. Растворы дигитонина готовили свежими в день опыта. Mg-АТР получали смешением эквимольных количеств $MgSO_4$ и трис-соли АТР (рН 7,4), которую получали ИОХ Na_2 -АТР («Keanal», Венгрия). Неорганические соли—отечественного производства, квалификации «хч».

Результаты исследования

Для изучения градиентов рН в синапсоммах, как и в предыдущих работах с изолированными СП мозга [7, 8], применили широко используемый флуоресцентный зонд АО. Незаряженная форма этого амина хорошо проникает через липидные мембраны, благодаря чему он накапливается в кислых компартментах пропорционально градиенту концентрации H^+ , так как протонированная форма (заряженная) через мембраны не проникает. Накопление АО в кислых компартментах сопровождается тушением его флуоресценции, которое в определенных условиях количественно связано с величиной градиента концентраций H^+ [10—12].

Добавление синапсом к среде, содержащей АО, вызывало тушение флуоресценции зонда (рис. 1). Тушение полностью обращалось при добавлении протонофора Cl-CCP, создающего проницаемость для H^+ , или слабых оснований. В качестве последних применяли метиламин либо соли аммония, диссоциирующие до аммиака в водных растворах. Действие слабых оснований обусловлено тем же механизмом, который лежит в основе действия АО (проникновение через мембраны в незаряженной форме и накопление в кислых компартментах), только их концентрация таковы, что протонирование незаряженной формы приводит к устранению самого градиента рН. АО также способен устранять градиенты рН при повышении концентрации выше 5 мкМ (не показано).

Как и следовало ожидать, слабые основания устраняли изменения флуоресценции АО быстро, тогда как действие Cl-CCP замедлялось, вероятно, образованием диффузионного мембранного потенциала этим электрогенным ионофором. Протонофор или слабые основания, если они присутствовали перед добавлением синапсом, предупреждали изменения флуоресценции АО. Эти наблюдения (рис. 1) показывают, что изменения флуоресценции АО в суспензии синапсом обусловлены присут-

ствием градиента рН, связанного с кислым компартментом. Ввиду того, что и зонд, и агенты, устраняющие ΔpH , проникают через мембраны, вопрос о локализации градиентов рН (на плазмалемме или на внутритерминальных мембранах) будет рассмотрен ниже.

Как известно, генерация ΔpH возможна только при условии обеспечения электронейтральности либо за счет сопряженного транспорта анионов, например, Cl^- , либо противотранспорта катионов (см. [12]). Однако тушение флуоресценции АО наблюдалось независимо от того, добавляли синапсомы в раствор Кребса-Рингера или в сахарозную среду, лишенную неорганических ионов (рис. 1). Это свидетельствует о том, что наблюдаемый ΔpH является эндогенным, а не индуцируется при добавлении синапсом в среду измерения.

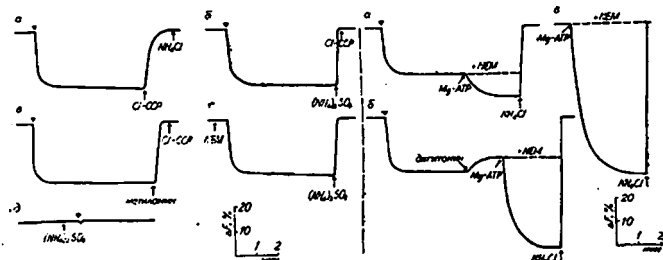


Рис. 1. Изменения флуоресценции акридиноранжа в суспензиях синапсом. а, в—д — в растворе Кребса-Рингера, б—в сахарозной среде. Момент добавления синапсом (120 мкг белка/мл) обозначен треугольником, других добавок — стрелками (10 мМ $Cl-CCP$, 10 мМ NH_4Cl , 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 мМ метиламин, 0,3 мМ NEM).

Рис. 2. Влияние $Mg-ATP$ на флуоресценцию акридиноранжа (АО) в суспензии контрольных (а) и пермеабилizованных дигитонином (б) или гипосмотическим шоком (в) синапсом. Обозначения те же, что и на рис. 1. Добавляли 30 мкМ дигитонин, 1 мМ $Mg-ATP$, 0,3 мМ NEM в KCl -среде. Небольшое повышение флуоресценции АО, вызванное неспецифическим взаимодействием с АТР [7, 8], вычтено при представлении данных.

Такой вывод подтверждается также тем, что непроникающий ингибитор АТР-зависимых H^+ -насосов в различных кислых компартментах клетки — NEM не влиял на эндогенный ΔpH (рис. 1). Не оказывал влияния и блокатор H^+ -насоса митохондрий — олигомицин. Отметим, что присутствие митохондрий (как свободных, так и находящихся внутри синапсом) не может повлиять на флуоресценцию АО, изменения которой специфичны в отношении кислых компартментов, поскольку в митохондриях ΔpH имеет противоположную направленность.

Степень тушения флуоресценции АО нелинейно связана с параметрами, определяющими кислый компартмент. В качестве количественной характеристики (размера) последнего удобно использовать отношение

потушенной флуоресценции зонда к непотушенной, так как оно пропорционально произведению концентрации H^+ на объем компартмента согласно известной формуле [10, 11]:

$$(F_0 - F)/F = [H^+]_{in} \times V_{in}/[H^+]_{ex} \times V_{ex},$$

где F_0 и F — исходный и конечный уровни флуоресценции, V — объемы кислого компартмента (in) и окружающей среды (ex) соответственно. Определяемая таким образом величина будет безразмерной, и применять ее можно только при сопоставимых условиях измерения.

Наблюдаемый экспериментально размер кислого компартмента должен линейно зависеть от концентрации белка синапсом. Как и в случае изолированных СП [12], линейная зависимость наблюдалась в сравнительно узком диапазоне концентраций, примерно до 0,10—0,15 мг белка/мл. Средняя удельная величина $(F_0 - F)/F$ для синапсом, суспендированных после выделения в растворе Кребса-Рингера, составила в 6 опытах $1,75 \pm 0,19$ мг⁻¹, что соответствует тушению флуоресценции на 14,9% при концентрации белка 0,1 мг/мл. Когда синапсомы после выделения суспендировали в сахарозной среде, эта величина составила $2,56 \pm 0,28$ мг⁻¹, что при 0,1 мг/белка/мл соответствует тушению флуоресценции на 20,4%. Эти отличия, очевидно, связаны с различной сохранностью кислого компартмента, так как при хранении на льду в растворе Кребса-Рингера способность синапсом аккумулировать АО заметно убывала и через 2—4 часа после выделения невозможно было достичь удовлетворительного уровня флуоресцентных ответов даже при высоких концентрациях белка. Напротив, в сахарозной среде кислый компартмент был достаточно стабильным в течение 6—8 ч.

Для выяснения локализации кислого компартмента и механизмов поддержания ΔpH изучали влияние энергетического субстрата активного транспорта ионов — Mg-АТР на флуоресцентные ответы АО в интактных и пермеабилзованных синапсомах. Пермеабиллизацию проводили либо обработкой дигитонином, который, взаимодействуя с холестерином, специфически разрушает плазмалемму, либо путем гипосмотического шока синапсом. В интактных синапсомах добавление Mg-АТР мало влияло на флуоресценцию АО, тогда как в синапсомах, пермеабилзованных любым из указанных способов, наблюдали резкое тушение флуоресценции, свидетельствующее о сильной дополнительной ацидификации (рис. 2). К такому же результату приводило замораживание и оттаивание синапсом. Таким образом, активность системы АТР-зависимого транспорта H^+ является латентной, а для ее выявления необходимо обеспечить доступ субстрата путем разрушения плазмалеммы синапсом.

Из рис. 2 видно, что наряду с активацией АТР-зависимой ацидификации дигитонин частично устраняет эндогенный ΔpH . Эти явления, однако, пространственно разделены, о чем свидетельствуют резкие отличия концентрационных зависимостей (рис. 3). Активация АТР-зависимого транспорта H^+ имеет 2-фазный характер, она резко убывает при повышении концентрации дигитонина выше 40—50 мкМ. Ясно, что только первая фаза концентрационной зависимости связана со специфич-

ческим действием дигитонина на плазматическую мембрану. Вторая же фаза объясняется неспецифичным детергентным действием при высоких концентрациях дигитонина, когда повреждаются также и те мембраны, где, очевидно, локализована система ацидификации. Показательно, что снижение активации АТР-зависимого транспорта H^+ происходит в том же диапазоне концентраций, в котором наблюдается резкое усиление вызванной дигитонином диссипации эндогенного ΔpH (рис. 3). Это свидетельствует, что компартменты, соответствующие градиентам pH , наблюдающимся и в отсутствие, и в присутствии АТР, идентичны, и в обоих случаях связаны только с внутритерминальными мембранами, но не с плазмалеммой синапсом.

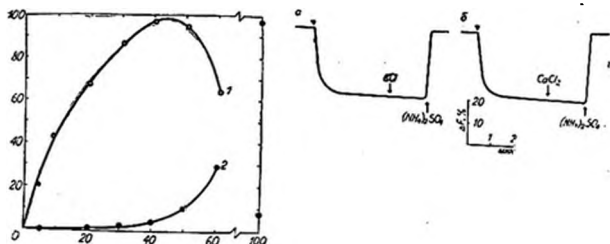


Рис. 3. Концентрационные зависимости влияния дигитонина на эндогенный и АТР-зависимый градиенты pH . 1—АТР-зависимая ацидификация, 2—скорость диссипации эндогенного ΔpH . Измерения проводили в KCl-среде. По оси абсцисс—концентрация дигитонина в μM , по оси ординат—изменение ΔpH в % от макс.

Рис. 4. Градиент pH на мембранах кислого компартмента при деполаризации: синапсом. а—добавлено 40 mM KCl в стандартный раствор Кребса-Рингера, б—добавлено 1,5 mM $CaCl_2$ в безкальциевый раствор Кребса-Рингера с повышенной концентрацией KCl (50 mM). Обозначения те же, что и на рис. 1

АТР-зависимая ацидификация, хотя и в значительно меньшей степени, наблюдается также в синапсомах, не подвергавшихся пермеабиллизации (рис. 2). Она проявляет те же свойства, что и в пермеабилизованных синапсомах: полностью зависит от присутствия Cl^- (максимальная активность в KCl-среде, нет активности в сахарозной среде) и подавляется низкими концентрациями NEM (рис. 2). Такие же свойства присущи H^+ -наосу синаптических пузырьков мозга [8, 12]. Как известно, часть синапсом имеет незамкнутую, проницаемую для макромолекул плазмалемму, не проявляя при этом признаков повреждения внутритерминальных мембран [13]. Очевидно, присутствие такой популяции поврежденных синапсом и объясняет происхождение активности, которая наблюдается без пермеабиллизации, но проявляет свойства, идентичные свойствам латентной активности.

Так как дигитонин даже в оптимальных концентрациях вызывает частичное повреждение мембран кислого компартмента (рис. 3), то для измерения степени латентности предпочтение следует отдать гипосмотическому шоку. Хорошо воспроизводимые результаты давала следующая процедура: к 0,10—0,15 мл синапсом добавляли 1,20—1,25 мл бидистиллированной воды и через 1 мин восстанавливали изотоничность прибавлением 0,6 мл 0,5 М KCl в 66,6 мМ HEPES/трис pH 7,4, затем еще через 1 мин добавляли Mg-АТР (1 мМ). Контрольные синапсосомы добавляли в среду после восстановления изотоничности и затем добавляли Mg-АТР. Для выражения АТР-зависимой ацидификации можно применять два параметра—скорость транспорта и общую (стационарную) аккумуляцию H^+ [8]. Однако прямое сравнение активностей будет осложниться тем, что в контрольных синапсосомах имеется значительный эндогенный ΔpH , который после гипосмотической обработки быстро диссипирует (рис. 2). Поэтому необходима соответствующая поправка, ввести которую легко в отношении общей аккумуляции H^+ путем вычитания аккумуляции, наблюдаемой в отсутствие АТР, то есть, эндогенного градиента pH, представленного в форме $(F_0 - F)/F$.

Содержание поврежденных синапсосом, рассчитанное как величина, обратная латентности, то есть как соотношение АТР-зависимой аккумуляции H^+ в контрольных и пермеабелизованных синапсосомах, колебалась между 15—25% в различных препаратах. Эта величина сравнима с оценками присутствия незакрытых синапсосом от 15 до 32%, основанными на проникновении коллоидных частиц или молекул пероксидазы внутрь синапсосом [13] и на латентности АТР-зависимой аккумуляции Ca^{2+} [14]. Латентность АТР-зависимой аккумуляции H^+ заметно снижалась при хранении синапсосом на льду в растворе Кребса-Рингера, в отличие от сахарозной среды, подобно тому, что отмечено выше в отношении диссипации эндогенного ΔpH . Несомненно, это свидетельствует о нарастающем процессе повреждения синапсосом в ионной среде, которое предупреждается сахарозой.

Большая часть кислого компартмента, вероятно, представлена синаптическими пузырьками (см. «Обсуждение»). Это дает уникальную возможность с помощью АО изучать состояние внутривезикулярной среды при высвобождении медиаторов, сопровождающемся процессами экзо- и эндоцитоза. Когда синапсосомы после предварительного уравнивания в Ca^{2+} -содержащем растворе Кребса-Рингера деполаризовали путем резкого повышения концентрации KCl до 30—50 мМ, уровень флуоресценции АО не изменялся (рис. 4). В другой постановке опытов синапсосомы помещали в бескальциевую среду с повышенной концентрацией калия (50 мМ) и инициировали высвобождение медиаторов добавлением $CaCl_2$ до 1,5 мМ. И в этом случае флуоресценция АО оставалась неизменной, что свидетельствует о стабильности внутривезикулярного pH.

С другой стороны, нельзя исключить, что выброс H^+ вместе с медиаторами все-таки происходит, но быстро компенсируется H^+ -насосом при прекращении контакта синаптических пузырьков с плазмалеммой. Поэ-

тому проверили также возможность изменения рН среды инкубации при деполяризующем воздействии. В этих опытах использовали слабо забуференную среду (1—2 мМ HEPES рН 7,4) с высокой концентрацией синапсом, а рН среды измеряли либо рН-чувствительным электродом, либо с помощью рН-индикатора бромтимолового синего. В последнем случае регистрировали поглощение 10 мкМ красителя в разностном режиме на волновой паре 618 и 648 нм на спектрофотометре «Hitachi 557» (Япония). Изменения рН среды при деполяризации синапсом повышением концентрации калия до 30—50 мМ не были обнаружены (данные не приводятся).

Обсуждение результатов

Используя флуоресцентный зонд АО, чувствительный к присутствию компартментов с повышенной концентрацией H^+ , мы подтвердили существование такого компартмента в синапсомах мозга. Очевидно, ни плазмалемма, ни цитоплазма не являются барьером для проникновения АО—легко диссоциирующего, проникающего слабого основания [10] к этому внутритерминальному компартменту. Как показывают опыты по пермеабиллизации синапсом, в частности, анализ концентрационной зависимости действия дигитонина (рис. 3), в использовавшихся нами условиях (рН 7,4) кислый компартмент является единственным источником флуоресцентных ответов АО.

Отсутствие вклада цитоплазматического компартмента означает, что градиент рН на плазмалемме отсутствует, либо он слишком мал и не обнаруживается при флуоресценции АО. В некоторых работах [15, 16] принимали, что в условиях, сходных с нашими, на плазмалемме синапсом имеется градиент рН порядка 0,2—0,4 единиц, однако доказательства нельзя считать убедительными. Например, аккумуляция метиламина, на основании которой пытались рассчитывать рН цитоплазмы [15], на самом деле отражает существование кислого компартмента, о чем свидетельствует, помимо прочего, и антагонизм между АО и метиламином, наблюдавшийся в настоящей работе. В другой работе [16] использовали индикатор, искусственно введенный в синапсомы, однако калибровку проводили в условиях, отличных от цитоплазматических, в частности, в отсутствие Mg^{2+} , который влияет на показания индикатора [16]. Трудности калибровки в подобных случаях обычно приводят к заниженным оценкам рН цитоплазмы [17].

Каков состав кислого компартмента синапсом? Из всех известных органелл, составляющих кислый компартмент клетки (лизосомы, аппарат Гольджи, эндосомы, окаймленные везикулы, секреторные гранулы), в синапсомах только два последних присутствуют в заметных количествах, причем преобладают СП (разновидность секреторных гранул), а окаймленные везикулы встречаются редко [13]. Характеристики АТР-зависимой ацидификации (ингибируемость низкими концентрациями NEM, абсолютная зависимость от наличия хлорида) в синапсомах совпадают со свойствами H^+ -насосов СП [6—8] и окаймленных везикул

[18]. Следовательно, кислый компартмент синапсом вполне надежно можно идентифицировать с СП и отчасти с окаймленными везикулами.

АТР-зависимую ацидификацию уже наблюдали в препаратах синапсом ранее, при сравнении различных органелл, используя зонд, родственник АО [19]. Однако авторы не установили ни происхождение этой активности, ни ее локализацию, оставляя впечатление, будто H^+ -насос локализован на плазмалемме и подкисляет цитоплазму, либо же Mg -АТР прекрасно проникает внутрь синапсом. На самом деле, как показывают наши опыты по пермеабилзации, АТР-зависимая ацидификация приурочена к внутритерминальным мембранам, отграничивающим кислый компартмент, и соответствует в основном H^+ -насосу СП. Часть активности и в наших опытах не была латентной, что объясняется присутствием популяции незамкнутых синапсом с поврежденной плазмалеммой.

Количественная оценка этой популяции на основе латентности АТР-зависимой ацидификации имеет несомненные преимущества по сравнению с другими методами. Она не требует длительной обработки, как в методе, основанном на проникновении коллоидных частиц [13], и гораздо менее подвержена ошибкам, присущим измерениям латентности АТР-зависимой аккумуляции Ca^{2+} , связанным с наличием нескольких компартментов [14]. В то же время предложенный нами метод выгодно отличается от распространенных методов, основанных на латентности лактатдегидрогеназы [20], которая, являясь цитоплазматическим ферментом, будет вымываться из поврежденных синапсом при выделении, что приведет к заниженным оценкам их присутствия.

В то же время в нашем подходе, основанном на измерении активности мембраносвязанного фермента— H^+ -насоса кислого компартмента, также существует вероятность заниженных оценок, если H^+ -насос будет инактивироваться параллельно с повреждением плазмалеммы. Такая возможность, однако, минимальна, поскольку даже в тех условиях, когда латентность АТР-зависимой ацидификации резко снижалась, например, после замораживания/оттаивания, общий уровень АТР-зависимой активности в пермеабилзованных синапсомах оставался практически неизменным. Значительно большую устойчивость внутритерминальных мембран подтверждают и данные о проникновении небольших коллоидных частиц: даже в тех синапсомах, плазмалемма которых была явно поврежденной, признаков повреждения внутритерминальных мембран не наблюдалось [13].

Повреждение плазмалеммы, по-видимому, прямо связано с диссипацией эндогенного ΔpH , наблюдающейся при хранении синапсом, или при замораживании/оттаивании. Оба процесса предупреждались при замене солевого раствора сахарозой, как это наблюдали в отношении другого маркера повреждения плазмалеммы—выхода лактатдегидрогеназы из цитоплазмы синапсом [21]. С другой стороны, эндогенный ΔpH резко снижается во время выделения. Об этом свидетельствует значительное превышение размера кислого компартмента (примерно на порядок) после добавления АТР к пермеабилзованным синапсомам по отношению к

исходному уровню в контрольных синапсосомах (рис. 2). Механизмы повреждения при выделении неясны, но имеют общий характер. Во всяком случае, когда для выделения применяли изотонические градиенты фиколла, присутствие поврежденных синапсосом не снижалось, следовательно, пребывание синапсосом в гиперосмотическом растворе сахаразы при выделении их по методу Hajos [9] не вызывает дополнительных повреждений.

Исследуя влияние деполяризации на кислый компартмент синапсосом, мы исходили из того, что при экзоцитозе СП ионы водорода могут освобождаться в среду. Отсутствие изменений кислого компартмента можно объяснить быстрой компенсацией потери протонов H^+ -насосом, учитывая кратковременность контакта СП с плазмалеммой. Однако мы не смогли обнаружить изменения рН среды инкубации, что объяснить труднее, особенно в свете данных об изменении рН при стимуляции срезов мозга, которые выражались в быстром, но небольшом подкислении, сменявшемся в течение примерно 100 мсек защелачиванием, в свою очередь переходившем в более мощное подкисление [23]. Как мы уже указывали выше, после выделения синапсосом концентрация H^+ в кислом компартменте сильно снижена. Вследствие этого чувствительность наших методов могла оказаться недостаточной. Но существует и другое объяснение. Синапсосомы являются пресинаптическими образованиями, тогда как изменения рН, обнаруженные при электрической стимуляции [23], могли быть обусловлены постсинаптическими механизмами. В этом отношении стоит отметить, что подобные трехфазные изменения рН недавно наблюдали при аппликации агонистов возбуждающего медиатора — глутамата [24].

В заключение отметим, что возможность применения АО для исследования кислого компартмента в синапсосомах открывает перспективы для решения различных вопросов, касающихся как физиологической роли кислого компартмента, так и его фармакологической чувствительности, в частности, выявления агентов, обладающих ацидотропным действием, особенно при сравнении их действия на изолированные СП.

AN ACIDIC COMPARTMENT AND A LATENT ACIDIFICATION SYSTEM IN BRAIN SYNAPTOSOMES

MELNIK V. I., TITOV S. Yu., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, USSR
Acad. of Medical Sci., Moscow

Compartmentation of H^+ in rat brain synaptosomes was studied by monitoring fluorescence changes of a permeant weak base, acridine orange (AO), in various media at pH 7, 4. The quenching of AO fluorescence obtained upon addition of synaptosomes and completely reversed by protonophore or weak bases indicates the presence of a compartment with low pH value (acidic compartment). The pH gradient detected with AO diminished fairly rapidly when synaptosomes were stored on ice in a salt medium but was enough stable in a sucrose medium. In 346

synaptosomes permeabilized by digitonin or hypoosmotic treatment, a latent activity of the ATP-dependent H^+ -pump was unmasked which provided additional acidification. The activity mentioned required the presence of chloride and was blocked by N-ethymaleimide. Analysis of the digitonin action revealed that pH gradients both in the absence and in the presence of ATP were not associated with plasmalemma. Thus the acidic compartment is restricted by intraterminal membranes and may be identical with synaptic vesicles where a similar H^+ -pump had been found earlier. Measurements of the nonmitochondrial H^+ -pump latency suggested that in 15–25% of the synaptosomes plasmalemma was damaged (unsealed). No changes in the acidic compartment were found when synaptosomes were depolarized by the enhancement of potassium concentration in the medium.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michaelson D. M., Angel I. *Life sci.*, v. 27, № 1, p. 39–44, 1980.
2. Földner H. H., Stadler H. *Eur. J. Biochem.*, v. 121, № 3, p. 519–524, 1982.
3. Hook V. Y. H., Loh Y. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci.*, v. 81, № 9, p. 2776–2780, 1984.
4. Toll L., Howard B. D. *Biochemistry*, v. 17, № 13, p. 2517–2523, 1978.
5. Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M. *Biochemistry*, v. 21, № 13, p. 3037–3043, 1982.
6. Stadler H., Tsukita S. *EMBO J.*, v. 3, № 13, p. 3333–3337, 1984.
7. Мельник В. И., Глебов Р. Н., Крымжановский Г. Н. *Бюл. exper. биол. и мед.*, т. 99, № 1, с. 35–38, 1985.
8. Мельник В. И., Глебов Р. Н. *Нейрохимия*, т. 6, № 4, с. 517–530, 1987.
9. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, № 3, p. 435–489, 1975.
10. Lee H.-C., Forte J. G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 508, № 2, p. 339–356, 1978.
11. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М., Наука, 1980.
12. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Титов С. Ю. *Биохимия*, т. 52, № 11, с. 1818–1828, 1987.
13. Fried R. C., Blaustein M. P. *J. Cell Biol.*, v. 78, № 3, p. 685–700, 1978.
14. Blaustein M. P., Ratzlaff R. W., Schweltzer E. S. *J. Gen. Physiol.*, v. 72, № 1, p. 43–66, 1978.
15. Akerman K. E. O., Heinonen E., Katta K., Scott I. G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 858, № 2, p. 275–284, 1986.
16. Richards C. D., Metcalfe J. C., Smith G. A., Hesketh T. R. *Biochim. et biophys. acta*, v. 803, № 3, p. 215–220, 1984.
17. Deutsch C. J., Kashtwagura T., Taylor J., Wilson D. F., Erecitska M. *J. Biol. Chem.*, v. 260, № 11, p. 6808–6810, 1985.
18. Xie X.-S., Stone D. K., Racker E. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 24, p. 14834–14838, 1983.
19. Cidon S., Ben-David H., Nelson N. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 19, p. 11654–11688, 1983.
20. Adam-Vizi V., Marchbanks R. M. *J. Neurochem.*, v. 41, № 3, p. 780–785, 1983.
21. Sperk G., Baldessarini R. J. *J. Neurochem.*, v. 28, № 6, p. 1403–1405, 1977.
22. Booth R. F. G., Clark J. B. *Biochem. J.*, v. 176, № 2, p. 365–370, 1978.
23. Крышталёв О. А., Осипчук Ю. В., Шелест Т. Н. *Бюл. exper. биол. и мед.*, т. 101, № 6, с. 643–645, 1986.
24. Endres W., Ballanyi K., Serve G., Grafe P. *Neurosci. Lett.*, v. 72, № 1, p. 54–58, 1986.

Поступила 2. XII 1987