

ПРЕСИННАПТИЧЕСКАЯ АУТОРЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГЛУТАМАТА В СТРИАТУМЕ КРЫС

ГОДУХИИ О. В., БУДАШЦЕВ А. Ю.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

В опытах с использованием методики локальной суперфузии мозга изучали влияние L-глутамата на высвобождение ^3H -глутамата из неостриатума наркотизированных нембуталом крыс. L-глутамат в концентрациях 10^{-8} — 10^{-7} М ингибировал вызванное K^+ -деполяризацией Ca^{2+} -зависимое высвобождение как предварительно захваченного ^3H -глутамата, так и ^3H -глутамата, образующегося из ^3H -глутамина. Тетродотоксин (10^{-6} М), а также антагонисты глутамата диэтиловый эфир глутаминовой кислоты (10^{-7} М) и D, L- α -аминоадипиновая кислота (10^{-7} М) не устраняли ингибирующего действия L-глутамата. Результаты согласуются с представлениями о существовании в области пресинаптических глутаматергических окончаний механизма ауторегуляции высвобождения глутамата, функционирующего по принципу отрицательной обратной связи.

Регуляция нейротрансмиттером своего собственного высвобождения получила название пресинаптической ауторегуляции. Наиболее серьезно концепция пресинаптической ауторегуляции была разработана для норадренергических синапсов периферической ЦНС позвоночных [1, 2]. Были получены также данные в пользу существования ауторегуляции через пресинаптические рецепторы и в катехоламинных синапсах ЦНС позвоночных [3, 4]. Однако для синапсов ЦНС другой нейротрансмиттерной специфичности такие данные менее убедительны, а в случае глутаматных синапсов этот вопрос не исследован вообще. Тем не менее изучение возможности существования механизмов пресинаптической ауторегуляции в самых разных синапсах ЦНС имеет ключевое значение для ответа на вопрос, являются ли эти механизмы общим принципом функционирования всех синаптических образований или же это частный случай, присущий, к примеру, только катехоламинным синапсам. Изучение этого вопроса актуально сейчас еще и потому, что в некоторых последних исследованиях ставится под сомнение сам факт существования механизма регуляции процесса высвобождения, осуществляемого через пресинаптические ауторецепторы [5, 6].

В связи с изложенным, мы в своей работе попытались выяснить возможность существования механизма пресинаптической ауторегуляции высвобождения глутамата на примере кортикостриатных глутаматергических нейронов мозга крысы.

Материалы и методы

В опытах была использована описанная нами ранее методика локальной суперфузии мозга с одновременной регистрацией электрической активности (вызванных потенциалов) из области суперфузии [7]. В ходе предварительной операции беспородным крысам-самцам массой 300—350 г стереотаксически по атласу Фифковой и

Маршалла вводили в неостриатум направляющую трубку с регистрирующим электродом ($AP = -1.5$; $L = 3$; $V = 4.5$), а во фронтальную кору биполярные стимулирующие электроды ($AP = -2.5$; $L = 1.5$). В опытах использовали только тех животных, у которых в ответ на электрическую стимуляцию фронтальной коры в области последующей суперфузии регистрировались вызванные потенциалы. В первой серии экспериментов животным предварительно в эту область через направляющую трубку вводили 10^{-3} моль 3H -глутамата ($M. A. 29 K_u$ /моль, «Amersham», Англия). Через 20 мин после введения начинали суперфузию данной области раствором Кребса-Рингера следующего состава (в мМ): $NaCl-126.5$; $KCl-2.4$; $KH_2PO_4-0.5$; $MgSO_4-1.1$; $CaCl_2-1.1$; $NaHCO_3-27.5$; глюкоза—3.9. Перед суперфузией раствор насыщали карбогеном до pH 7.4. Скорость тока суперфузионной среды была равна 50 мкл/мин.

Во второй серии экспериментов у животных сразу начинали суперфузию неостриатума раствором Кребса-Рингера того же состава, но дополнительно содержащего 3H -глутамин ($M. A. 20 K_u$ /моль, «Amersham», Англия), в концентрации 10^{-6} М. Через 60 мин в обеих сериях экспериментов собирали 3—4 последовательные 20-минутные фракции суперфузата для последующего измерения в них уровней высвобождаемого 3H -глутамата. Уровень 3H -глутамата в первой 20-минутной фракции принимали за 100% и относительно его оценивали уровни во II—IV фракциях. Изменение концентрации K^+ в среде, а также добавление фармакологических веществ проводили во время прохождения II 20-минутной фракции через мозг. При повышении концентрации K^+ в среде до 60 мМ эквивалентно снижали концентрацию Na^+ .

Измерение уровней 3H -глутамата во фракциях производили с помощью ПОХ. Процедура разделения 3H -глутамата от продуктов его метаболизма в суперфузате и способ измерения его количества в первой серии экспериментов были описаны нами ранее [8—10]. Во второй серии экспериментов выделение и измерение 3H -глутамата, образующегося из 3H -глутаминна, проводили по методике, описанной ранее [11].

Достоверность различия уровней 3H -глутамата в собранных фракциях у сравниваемых групп животных оценивали по критерию Стьюдента. В конце экспериментов проводили морфоконтроль положения канюли и электродов.

Результаты и обсуждение

Существующие в настоящее время данные указывают на то, что нейротрансмиттерный пул глутамата в пресинаптическом окончании пополняется как за счет его формирования из глутаминна, так и за счет обратного захвата глутамата этими окончаниями из внеклеточной среды [10]. В связи с этим мы в качестве предшественника высвобождаемого пула глутамата использовали 3H -глутамат и 3H -глутамин.

На рис. 1 показано, что добавление глутамата (10^{-6} — 10^{-7} М) к суперфузионной среде приводило к ингибированию высвобождения 3H -глутамата, вызванного высокой концентрацией калия в среде (K^+ -деполяризация). Это наблюдалось как в случае высвобождения предварительно введенного экзогенного 3H -глутамата, так и высвобождения 3H -глутамата, образующегося из 3H -глутаминна. Вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение 3H -глутамата в обоих случаях зависело от наличия Ca^{2+} в суперфузионной среде. В случае предварительно введенного 3H -глутамата это было показано нами ранее [8], а данные высвобождения 3H -глутамата, образующегося из 3H -глутаминна приведены на рис. 2. С другой стороны, при спонтан-

ном высвобождении (когда отсутствуют деполяризующие стимулы, вызывающие Ca^{2+} -зависимое высвобождение ^3H -глутамата) экзогенный глутамат в тех же концентрациях усиливал высвобождение предварительно введенного ^3H -глутамата в зависимости от концентрации глутамата в суперфузионной среде (рис. 3).

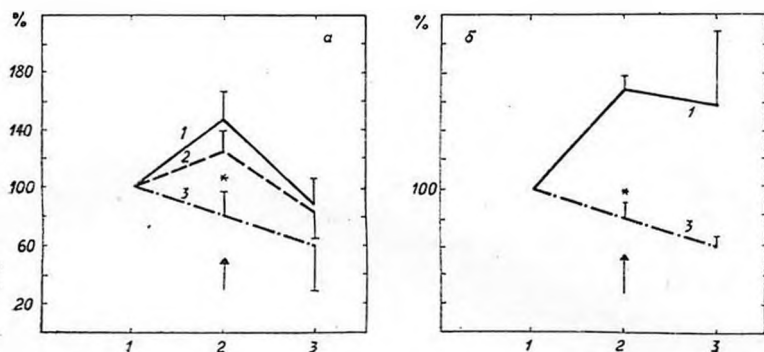


Рис. 1. Влияние глутамата на высвобождение ^3H -глутамата, вызванное K^+ -деполяризацией в стриатуме; а—в качестве предшественника использовали предварительно введенный ^3H -глутамат, б—в качестве предшественника использовали ^3H -глутамин. Здесь и далее на оси абсцисс отмечены фракции суперфузата; на оси ординат—уровень высвобождаемого ^3H -глутамата (% относительно уровня в I фракции). 1— K^+ -деполяризация; 2— K^+ -деполяризация+глутамат (10^{-8} M); 3— K^+ -деполяризация+глутамат (10^{-7} M); стрелкой отмечен уровень высвобождаемого ^3H -глутамата во II фракции суперфузата. *—различие между уровнями ^3H -глутамата во II фракции суперфузата у сравниваемых групп животных достоверно ($p < 0,05$).

Таким образом, глутамат в концентрациях 10^{-8} — 10^{-7} M , введенный во внеклеточную среду, ингибирует вызванное деполяризующими стимулами Ca^{2+} -зависимое высвобождение как предварительно захваченного ^3H -глутамата, так и ^3H -глутамата, образующегося из ^3H -глутаминна.

Для выяснения вопроса, оказывает ли введенный глутамат прямое действие на пресинаптические глутаматергические окончания или же он действует опосредованно через interneurons неостриатума, в суперфузионную среду одновременно с глутаматом добавляли тетродотоксин в концентрации 10^{-6} M . Как видно из табл. 1, тетродотоксин достоверно не влиял на ингибирующее действие глутамата. Известно, что это вещество в концентрации 10^{-6} M блокирует проведение потенциала действия по электровозбудимой мембране и нарушает, таким образом, проведение импульса между нейронами. Поэтому сохранение ингибирующего действия глутамата при наличии тетродотоксина можно интерпретировать в пользу того факта, что экзогенный глута-

мат влияет непосредственно на пресинаптические окончания, которыми был предварительно поглощен ^3H -глутамат. Таким образом, полученные данные согласуются с представлениями о том, что в глутаматных синапсах, также как и в других синапсах мозга млекопитаю-

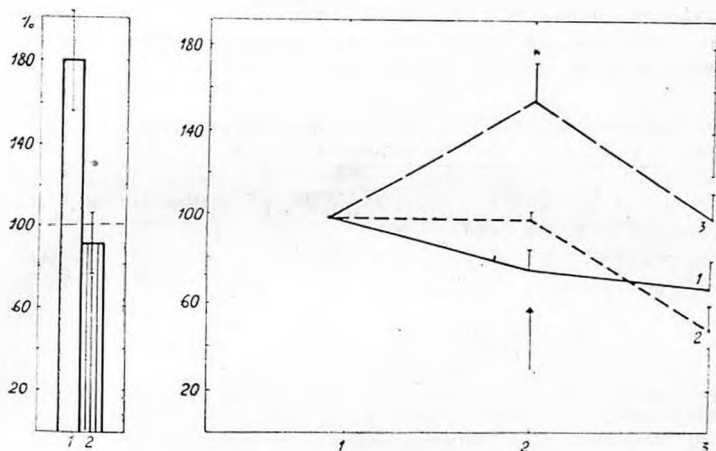


Рис. 2. Изменение высвобождаемого ^3H -глутамата, образующегося из ^3H -глутаминна (в%), под влиянием высокой концентрации K^+ в среде (60 мМ) при прохождении II фракции через мозг. 1—при нормальной концентрации Ca^{2+} в среде; 2—без Ca^{2+} в среде

Рис. 3. Влияние глутамата на спонтанное высвобождение предварительно введенного ^3H -глутамата. 1—спонтанное высвобождение, 2—влияние глутамата в концентрации 10^{-8} (показано стрелкой) на спонтанное высвобождение; 3—влияние глутамата в концентрации 10^{-7} М. *—различие между уровнями ^3H -глутамата во II фракции суперфузата у сравниваемых групп достоверно ($p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние тетродотоксина на ингибирующее действие экзогенного глутамата

Воздействие	Фракция II (K^+ -деполяризация, %)	Фракция III (отмычка, %)
Контроль	153±23	81±17
Глутамат (10^{-7} М)	74*±21	51±28
Глутамат (10^{-7} М) + тетродотоксин (10^{-7} М)	102±1	69±20

Примечание. *—значение уровня высвобождаемого ^3H -глутамата, достоверно ($p < 0,05$) отличающееся от контрольного.

щих, существует механизм пресинаптической ауторегуляции высвобождения глутамата, функционирующий по принципу отрицательной обратной связи. Этот механизм, судя по полученным результатам, за-

висит от концентрации глутамата во внеклеточной среде и запускается достаточно низкими концентрациями внеклеточного глутамата (порядка 10^{-8} — 10^{-7} М). Поскольку ингибированию подвергалось высвобождение как предварительно захваченного ^3H -глутамата, так и ^3H -глутамата, образующегося из ^3H -глутамина, то это указывает на то, что мишенью действия глутамата является непосредственно процесс высвобождения нейротрансмиттера.

Таблица 2

Влияние блокаторов рецепторов глутамата на ингибирующее действие экзогенного глутамата

Воздействие	Фракция II (K^+ -деполяризация, %)	Фракция III (отмывка, %)
Контроль	153±23	81±17
Глутамат (10^{-7} М)	74±21	51±28
Глутамат (10^{-7} М) + ДЭЭГ (10^{-7} М)	33±3	31±12
Глутамат (10^{-7} М) + ААК (10^{-7} М)	53±7	42±5

Примечание. ДЭЭГ—диэтиловый эфир глутаминовой кислоты, ААК—аминоадипиновая кислота; *—значения уровней высвобождаемого ^3H -глутамата, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от соответствующих контрольных.

С целью идентификации фармакологического типа рецепторов, через которые глутамат может опосредовать свое ингибирующее действие, в суперфузионную среду одновременно с глутаматом добавляли его антагонисты. Из табл. 2 видно, что ни диэтиловый эфир глутаминовой кислоты (10^{-7} М), ни D, L- α -аминоадипиновая кислота (10^{-7} М) не только не устраняли ингибирующее действие глутамата, но даже усиливали его. Можно предположить, что, по-видимому, ингибирующее действие глутамата не опосредовано рецепторами, чувствительными к этим антагонистам. Добавление в суперфузат одной D, L- α -аминоадипиновой кислоты в концентрации 10^{-7} М достоверно не влияло ни на спонтанное, ни на вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение ^3H -глутамата (данные не приведены). Этот факт также свидетельствует в пользу того, что ингибирующее действие глутамата опосредовано рецепторами, нечувствительными к этому антагонисту.

Таким образом, полученные результаты не позволили идентифицировать фармакологический тип рецепторов, через которые глутамат опосредует свое ингибирующее действие. Однако можно отметить, что эти рецепторы не относятся к N-метил-D-аспартатному типу, так как специфический блокатор этих рецепторов D, L- α -аминоадипиновая кислота [12, 13] не устраняла ингибирующего действия глутамата.

PRESYNAPTIC AUTOREGULATION OF GLUTAMATE RELEASE IN RAT STRIATUM

GODUKHIN O. V., BUDANTZEV A. Yu.

Institute of Biophysics, USSR, Academy of Sciences, Poustchino

The effect of L-glutamate on ^3H -glutamate release from neostriatum of nembuthalized rats has been studied, by means of local brain superfusion. L-glutamate (10^{-8} — 10^{-7}) inhibits K^{+} -depolarization induced Ca^{2+} -dependent release of both ^3H -glutamate formed from ^3H -glutamine and of applicated ^3H -glutamate. Tetrodotoxin (10^{-6}) and antagonists of glutamate: diethylester of glutamic acid (10^{-7} M) and D, L- α -amino adipic acid (10^{-5} M) didn't abolish the inhibitory effect of L-glutamate. Data obtained are in agreement with the current concept of the autoregulation of glutamate release in presynaptic glutamatergic endings by feed back mechanism.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ланжер С. З.—В кн.: Нейротрансмиттерные системы (под ред. Н. Д. Легга), с. 38—59, М., Медицина, 1982.
2. Langer S. F. Trends Neuroscience, v. 3, № 5, p. 110—112, 1980.
3. Жарикова А. Д., Годухин О. В. Физiol. журн. СССР, т. 71, № 1, с. 105—111, 1985.
4. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176, М., Медицина, 1982.
5. Katsner S. Fed. Proc., v. 43, p. 1358—1364, 1984.
6. Laduron P. M. Trends in Pharmac. Science, № 6, p. 459—461, 1984.
7. Годухин О. В., Жарикова А. Д. Физiol. журн. СССР, т. 65, № 1, с. 141—142, 1979.
8. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. Физiol. журн. СССР, т. 68, № 6, с. 745—751, 1982.
9. Годухин О. В., Буданцев А. Ю., Селифонова О. В., Агапова В. И. Физiol. журн. СССР, т. 69, № 12, с. 1563—1568, 1983.
10. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. Успехи соврем. биол., т. 95, вып. 3, с. 383—397, 1983.
11. Dolphin A. C. Brain Res., v. 252, p. 111—116, 1982.
12. Fagg G. E. Trends Neuroscience, № 3, p. 207—210, 1985.
13. Olney J. W.—In methods in Enzymology (ed. Conn P. M.), v. 103, part II. N. Y.—London, Acad. Press., p. 379—392, 1983.

Поступила 13. I 1986