

МОДУЛЯЦИЯ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОГО ПРОЦЕССА В НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ ИЗ МОЗГА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ГЛУТАМАТА

Поступила 10.12.09

Мы изучали внутриклеточные процессы, происходящие в нервных окончаниях нейронов головного мозга крыс в ответ на аппликацию экзогенного глутамата. Используя рН-чувствительный флуоресцентный зонд акридин оранжевый (АО) и меченую гамма-аминомасляную кислоту ($[^3\text{H}]$ ГАМК), оценивали влияние аппликации глутамата на уровень ацидификации синаптических везикул и высвобождение ГАМК из нервных терминалей (синапсосом), полученных из ткани гиппокампа. Результаты экспериментов показали, что глутамат дозозависимо стимулировал высвобождение $[^3\text{H}]$ ГАМК из нервных терминалей, после чего наблюдался обратный захват данного нейротрансмиттера. Селективный блокатор транспортеров ГАМК (NO-711) полностью блокировал захват нейротрансмиттера, но не влиял на высвобождение последнего; данное наблюдение указывает на то, что глутаматиндуцированный выброс ГАМК происходил из везикулярного, но не из цитозольного пула. Подтверждением стимуляции глутаматом процесса экзоцитоза стали результаты экспериментов с АО, в которых были получены свидетельства двухфазности указанного процесса. Первая фаза, отражающая, по всей видимости, кальций-индуцированный экзоцитоз, выглядела как «всплеск» флуоресцентного сигнала, характерный для ответа синапсосом на воздействие KCl в деполяризующих концентрациях. Обе фазы ответа полностью блокировались или существенно подавлялись в условиях бескальциевой среды или в присутствии 25 мкМ Cd^{2+} . Вторая («медленная») фаза ответа развивалась после определенного лаг-периода и характеризовалась постепенным увеличением интенсивности флуоресцентного сигнала. Эта фаза оказалась полностью зависимой от присутствия натрия во внеклеточной среде и полностью блокировалась при замене натрия холином или N-метил-D-глукламином. Предполагается, что вторая фаза ответа может отражать либо спонтанный нестимулированный экзоцитоз, либо диссипацию протонного градиента в синаптических везикулах, индуцированную входом ионов Na^+ в нервное окончание.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пресинаптические глутаматные рецепторы, высвобождение ГАМК, ацидификация синаптических везикул, акридин оранжевый.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследований последнего десятилетия продемонстрировали исключительно важную роль, которую играют пресинаптические рецепторы нейротрансмиттеров в модуляции функциональных взаимодействий нейронов. Подобную модуляторную функцию пресинаптических рецепторов, про-

являющуюся в усилении или ингибировании процесса нейросекреции из аксонных терминалей, чаще всего рассматривают как один из основных механизмов, которые обеспечивают развитие кратковременной и долговременной синаптической пластичности [1]. Участие гомо- и гетерорецепторов различных типов в модуляции химической нейротрансдачи в ЦНС детально обсуждалось в ряде обзорных статей [2–4]. К настоящему моменту убедительно установлена важная роль рецепторов адреналина, серотонина и ацетилхолина в упомянутых модуляторных процессах. Особое внимание

¹ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: tas@biochem.kiev.ua (А. С. Тарасенко).

при этом уделяют пресинаптическим рецепторам глутамата. Использование специфических агонистов глутаматных рецепторов позволило выявить наличие ионотропных и метаботропных рецепторов на мембранах аксонных терминалей нейронов практически всех типов [5–8].

Тем не менее, несмотря на проведение многочисленных исследований, представления о роли глутаматных рецепторов в модуляции тормозной нейротрансдачи весьма неоднозначны. Сообщалось, что активация как каинатных [9–12], так и НМДА-рецепторов пресинаптических структур [5, 13] приводит к усилению ГАМК-эргической нейротрансмиссии. В то же время имеются ряд данных, свидетельствующих об ингибировании нейросекреции ГАМК в условиях действия агонистов глутаматных рецепторов [14]. Каковы могут быть механизмы реализации подобных разнонаправленных эффектов, являющихся следствием активации одних и тех же ионотропных рецепторов, остается неясным. Так же неоднозначны и взгляды на роль метаботропных пресинаптических глутаматных рецепторов в секреции ГАМК. С одной стороны, имеются данные об усилении ГАМК-эргической нейротрансмиссии при активации этих рецепторов [15]. С другой стороны, сообщалось о негативном влиянии активации таких рецепторов на секрецию ГАМК. В последнем случае ингибирование глутаматом секреции ГАМК может иметь своим потенциальным следствием глобальное перевозбуждение ЦНС. В мозжечке, однако, такая модуляция приводит к локальному уменьшению интенсивности торможения и усилению эффектов возбуждения нервных волокон [16].

Следует отметить, что подавляющая часть данных о влиянии глутамата на процессы нейротрансдачи были получены в электрофизиологических экспериментах, в которых основным критерием, позволяющим оценить эффект активации пресинаптических глутаматных рецепторов, являлось изменение частоты и амплитуды регистрируемых синаптических токов в постсинаптических структурах. Крайне малые геометрические размеры большинства нервных терминалей являются серьезным препятствием для успешного проведения прямых измерений соответствующих феноменов в пресинаптических образованиях. В связи с этим информация о тех внутриклеточных процессах, которые запускаются глутаматом в пресинаптической нервной терминали и приводят, в конечном итоге, к модуляции выброса нейромедиатора, остается весьма неоднозначной.

В настоящем исследовании мы старались идентифицировать процессы, развивающиеся в пресинаптических нервных структурах в ответ на аппликацию экзогенного глутамата – природного лиганда глутаматных рецепторов всех типов. В работе были использованы синаптосомы, полученные из мозга крыс, т. е. изолированные нервные терминали, представляющие собой адекватную и удобную модель для изучения пресинаптических процессов. Обладая высоким уровнем метаболической компетентности, такая модель дает возможность не только оценить интенсивность секреторных ответов, но и подойти к интерпретации внутриклеточных процессов, лежащих в их основе. Об активности секреторного процесса судили по высвобождению меченой ГАМК из исследуемых нервных терминалей, а также по изменению протонного градиента в синаптических везикулах. Последний показатель является ключевым критерием функционального состояния синаптосом.

Результаты проведенных исследований показали, что в синаптических терминалях из мозга крыс экзогенный глутамат индуцирует развитие двухфазного процесса. Его фазы в разной степени зависят от присутствия во внеклеточной среде ионов кальция и натрия. Начальная («быстрая») фаза кальцийзависима и, судя по характеру ответа, представляет собой стимулированный экзоцитоз. Вторая же («медленная») фаза полностью блокировалась в отсутствие внеклеточного натрия. По всей видимости, она является отражением асинхронного нестимулированного экзоцитоза или диссипации протонного градиента в синаптических везикулах.

МЕТОДИКА

Все эксперименты были выполнены согласно «Процедурам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным Комиссией Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины по уходу, содержанию и использованию экспериментальных животных.

Получение синаптосом из тканей коры и гиппокампа головного мозга крыс. В экспериментах использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 150–200 г. После декапитации у животных немедленно извлекали мозг, быстро выделяли гиппокамп и кору больших полушарий и гомогенизировали эти образцы с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера (зазор 0.2 мм) в охлажденной

среде следующего состава: 0.32 М сахарозы, 0.2 мМ ЭДТА, 5 мМ НЕРЕС (рН 7.4). Полученные гомогенаты центрифугировали при 2500g в течение 5 мин для осаждения клеточных ядер, фрагментов кровеносных сосудов, относительно крупных фрагментов нервных и глиальных клеток. Надосадочные фракции центрифугировали при 15000g в течение 12 мин, и полученные осадки рассматривались как фракции неочищенных синапсом. Все операции проводили на холоде (0–4 °С).

Для получения фракции очищенных синапсом осадок, полученный при 15 000g, ресуспендировали в среде выделения и центрифугировали 45 мин при 70 000g в градиенте плотности фикола (4, 6 и 13 %). Фракцию, полученную в интерфазе между 13 и 6 % фикола, собирали, разводили средой выделения в соотношении 1:4 и центрифугировали 20 мин при 15 000g. Осадок рассматривался как фракция очищенных синапсом [17].

Синапсомы суспендировали в охлажденном оксигенированном стандартном солевом растворе следующего состава (в миллимолях на 1 л): NaCl – 126, KCl – 5, MgCl₂ – 1.4, NaH₂PO₄ – 1, НЕРЕС – 20, d-глюкоза – 10 (рН 7.4). Кальцийсодержащая среда включала в себя стандартный солевой раствор и 1 мМ СаСl₂. Бескальциевая среда не содержала в себе СаСl₂, и в нее вносили 100 мкМ ЭГТА.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации Ларсона [18].

Определение высвобождения [³H]ГАМК. Согласно результатам предварительных экспериментов, проведенных на очищенных и неочищенных фракциях синапсом, в процессах, которые наблюдались в препаратах обоих видов, прослеживались одинаковые закономерности. Это позволило в дальнейшем сократить процедуру получения объекта исследования и использовать в качестве основного препарата неочищенные синапсомы.

Синапсомы (2 мг белка/мл) после преинкубации в оксигенированном стандартном солевом растворе в течение 10 мин при 37 °С нагружали меченой ГАМК (³H]ГАМК, 5 · 10⁻⁷М) в течение 10 мин. При проведении всех процедур, обеспечивающих нагружение синапсом [³H]ГАМК и высвобождение последней, солевой раствор содержал в себе ингибитор трансаминазы ГАМК – аминоксиуксусную кислоту в концентрации 100 мкМ. После нагружения суспензию синапсом охлаждали на льду, разводили в 10 раз охлажденным оксигенированным солевым раствором, центрифугировали при 5 мин 4 000g, а осадок ресуспен-

дировали в солевом растворе таким образом, чтобы конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл. Полученную суспензию синапсом немедленно использовали для проведения экспериментов. Высвобождение [³H]ГАМК из синапсом измеряли следующим образом: аликвоты суспензии (120 мкл) преинкубировали 10 мин при 37 °С и после добавления агентов, стимулирующих высвобождение нейромедиатора, инкубировали дополнительно 5 мин. Затем пробы немедленно центрифугировали в микроцентрифуге (15 с при 10000g), и в отобранные 90 мкл супернатанта добавляли по 1.5 мл сцинтилляционной жидкости ACS. Для измерения радиоактивности использовали счетчик «Tracor Analytic Delta 300» (США). Уровень высвобождения [³H]ГАМК из синапсом без добавления стимулирующих агентов принимался за базальный. Стимулированное высвобождение рассчитывали как разность между выходом [³H]ГАМК под влиянием стимулирующих агентов и базальным высвобождением. Содержание [³H]ГАМК в супернатантах выражали как нормированную величину, принимая общее содержание [³H]ГАМК в синапсом за 100 %. Численные значения представлены ниже как средние ± ошибка среднего.

Оценка уровня acidификации синаптических везикул в синапсомозах крыс. Acidификацию синаптических везикул оценивали с помощью рН-чувствительного флуоресцентного зонда акридина оранжевого (АО), который накапливается в кислых компартментах клетки пропорционально рН-градиенту [19, 20]. К синапсомам (конечная концентрация белка 0.2–0.4 мг/мл) добавляли АО (конечная концентрация 5 мкМ), и регистрировали кинетику входа красителя в синаптические везикулы. После достижения стационарного уровня флуоресценции зонда (15-я мин) к синапсомам добавляли глутамат и оценивали изменение интенсивности флуоресцентного сигнала (F₀). Измерения проводили с помощью флуоресцентного спектрофотометра «Signe-4» («Люмтек», Латвия) в термостатируемой кювете (37 °С) при постоянном перемешивании суспензии синапсом. Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 490 и 530 нм соответственно, а ширина щелей – 5 нм. Значение F₀, отражающее флуоресценцию зонда в нулевой момент времени, получали путем экстраполяции функции экспоненциального затухания по отношению к t = 0.

Количественная обработка данных. Статистическую обработку данных, построение графиков и расчеты кинетических характеристик проводили

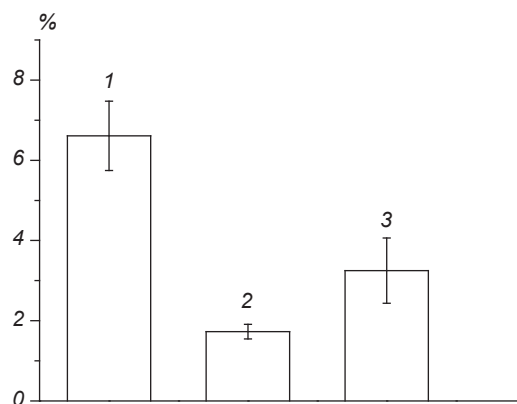
ли с применением программы “Microsoft Origin Pro 8.0”. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя *t*-критерий Стьюдента и принимая за граничное значение $P \leq 0.05$.

Материалы. В экспериментах были использованы следующие материалы и реактивы: [³H]ГАМК (94 Ки/моль) и сцинтилляционная жидкость ASC производства “Amersham” (Великобритания); 4-аминопиридин – 4-АП (“RBI”, США); фиколл-400, аминоксисацетат, d-глюкоза, L-глутамат и HEPES (“Sigma”, США); АО (“Molecular Probes”, США). Остальные реактивы были отечественного производства категории х. ч. (“Реахим”, Украина).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние глутамата на высвобождение [³H]ГАМК из синапсом гиппокампа мозга крыс. Согласно результатам исследований последних лет, на поверхности ГАМК-эргических терминалей локализованы глутаматные рецепторы, активация которых может стимулировать или ингибировать тормозную нейротрансдукцию путем регуляции процесса высвобождения ГАМК из этих терминалей [6, 8, 9, 11–13]. С целью выяснения влияния активации пресинаптических глутаматных рецепторов на ГАМК-эргическую нейротрансдукцию мы измеряли кальцийзависимое высвобождение [³H]ГАМК из предварительно нагруженных меченым нейротрансмиттером синапсом, развивающееся после добавления глутамата. Контролем функционального состояния нервных терминалей служил ответ синапсом на аппликацию блокатора калиевых каналов 4-АП, который является достаточно специфическим стимулятором процесса экзоцитоза в ГАМК-эргических терминалях [21].

На рис. 1 представлены данные о влиянии глутамата на высвобождение [³H]ГАМК из синаптических терминалей гиппокампа в пределах 5-минутного периода наблюдения. Для оценки эффективности глутамата его действие сравнивали с действием 4-АП. Как видно из рисунка, добавление 1 мМ глутамата к гиппокампальным синапсам стимулировало высвобождение [³H]ГАМК, количество которого (в среднем 3.25 ± 0.81 %) оказалось лишь вдвое меньшим количества нейромедиатора, высвободившегося в ответ на деполяризацию синапсом под действием 2 мМ 4-АП (6.6 ± 0.86 %). При снижении концентрации глутамата от 1 до 0.5 мМ высвобождение

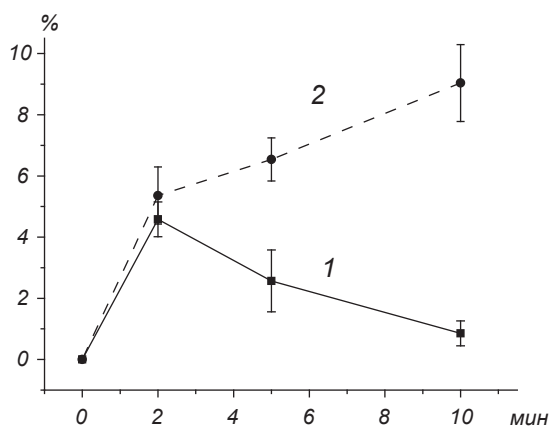


Р и с. 1. Интенсивность высвобождения [³H]ГАМК (%) из нервных терминалей (синапсом) гиппокампа в течение 5-минутного периода наблюдения под действием 2 мМ 4-аминопиридина (1), а также 0.5 (2) и 1.0 (3) мМ глутамата в кальцийсодержащей среде ($n = 5$). Данные нормированы относительно значений общего накопления [³H]ГАМК, принятых за 100 %.

Р и с. 1. Интенсивність вивільнення [³H]ГАМК (%) з нервних терміналей (синапсом) гіпокампа протягом 5-хвилинного періоду спостереження під дією 2 мМ 4-амінопіридину (1), а також 0.5 (2) і 1.0 (3) мМ глутамату в кальційвмісному середовищі ($n = 5$).

[³H]ГАМК уменьшалось в среднем до 1.73 ± 0.18 %; данный факт указывает на дозозависимость эффекта глутамата.

Выделение ГАМК из пресинаптической структуры, как известно, может быть следствием либо процесса экзоцитоза, либо выхода медиатора из цитозоля в результате реверсного функционирования транспортеров ГАМК. Чтобы ответить на вопрос, какой же из этих механизмов функционирует в результате активации пресинаптических глутаматных рецепторов, мы исследовали кинетику высвобождения [³H]ГАМК под действием глутамата в условиях отсутствия и присутствия в среде NO-711 – специфического несубстратного ингибитора ГАМК-транспортеров. Высвобождение [³H]ГАМК оценивали на 2-й, 5-й и 10-й мин после добавления глутамата. Из рис. 2 видно, что в отсутствие NO-711 максимальное повышение внеклеточного уровня нейротрансдуктора приходилось на 2-ю мин, к 5-й мин количество [³H]ГАМК во внеклеточной среде уменьшалось, а к 10-й мин уровень приближался к исходному низкому значению. В присутствии NO-711 резкое увеличение уровня [³H]ГАМК во внеклеточной среде через 2 мин после добавления глутамата сохранялось, но последующего уменьшения



Р и с. 2. Интенсивность высвобождения $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) из нервных терминалей гиппокампа под действием 1 мМ глутамата в норме (1) и в присутствии 30 мкМ NO-711 (2).

По оси абсцисс – время наблюдения, мин; по оси ординат – количество высвобожденного $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, %. Данные нормированы относительно значений общего накопления $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, принятых за 100 %.

Р и с. 2. Інтенсивність вивільнення $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (%) з нервних терміналей гіпокампа під дією 1 мМ глутамату в нормі (1) та в присутності 30 мкМ NO-711 (2).

уровня данного передатчика не происходило. Характер секреторного ответа (резкий выброс ГАМК, сохраняющийся в присутствии блокатора транспортера ГАМК) позволяет предположить, что экзогенный глутамат стимулирует именно процесс экзоцитоза, но не высвобождение нейротрансмиттера из цитозольного пула. Дальнейшее же быстрое снижение внеклеточного уровня ГАМК, наблюдаемое в контроле, обусловлено функционированием транспортеров ГАМК, локализованных в плазматических мембранах терминалей. Такой вывод подтверждается результатами опытов, проведенных в присутствии блокатора упомянутых транспортеров NO-711; в данных условиях мы не наблюдали снижения внеклеточного уровня ГАМК.

Таким образом, согласно полученным результатам, глутамат может выступать в роли стимулятора ГАМК-эргической нейротрансдачи. Чтобы выяснить, какие внутриклеточные процессы происходят при этом в пресинаптических нервных терминалях (что приводит в конечном итоге к выбросу нейротрансмиттера), была проведена серия экспериментов с использованием рН-чувствительного флуоресцентного зонда АО.

Изменение степени acidификации синаптических везикул нервных терминалей под действием глутамата. АО представляет собой липофильный амин, незаряженная форма которого легко проникает через плазматическую мембрану и накапливается в структурах клетки, обладающих способностью аккумулировать протоны. В нервных терминалях к таким структурам относятся главным образом синаптические везикулы, внутри которых значение рН близко к пяти; это существенно ниже рН цитозоля. Использование АО дает возможность регистрировать процесс экзо/эндоцитоза, т. е. готовность везикул к нейросекреции, и состояние протонного градиента, который отражает способность везикул аккумулировать нейротрансмиттер [19, 20].

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по изучению влияния глутамата на уровень acidификации синаптических везикул. Как видно из рисунка, добавление 5 мкМ АО к суспензии синапсом сопровождалось тушением флуоресценции зонда в результате протонирования последнего внутри везикул. Последующее добавление глутамата вызывало изменение интенсивности флуоресцентного сигнала, которое четко указывало на двухфазный характер процесса. При аппликации 1 мМ глутамата первая (“быстрая”) фаза представляла собой резкое увеличение интенсивности флуоресценции АО (в течение 5–10 с) с последующим ее ослаблением вплоть до исходного уровня. Первая фаза ответа на аппликацию глутамата была сходна с наблюдаемой в случае аппликации 30 мМ KCl; данное воздействие, приводя к деполаризации плазматической мембраны, стимулирует процесс экзоцитоза в кальцийсодержащей среде. Резкое увеличение интенсивности флуоресценции АО является следствием высвобождения содержимого синаптических везикул (в том числе и накопленного зонда) во внеклеточное пространство в результате слияния везикул с плазмолеммой. Возврат же интенсивности флуоресценции к исходному уровню (что четко видно из рисунка) отражает процесс поглощения зонда в ходе рециклизации везикул, поскольку экзоцитоз и эндоцитоз являются сопряженными процессами. Продолжительность всего подобного цикла составляла порядка 60 с. Это в целом согласуется с данными Райена и соавт. [22], показавших, что половинное время рециклинга везикул составляет около 20 с. Таким образом, характер начальной фазы ответа на действие глутамата дает основания полагать, что первичным ответом на активацию глутаматных пресинаптических

ских рецепторов является стимуляция процесса экзоцитоза.

После завершения первой начинала развиваться вторая, более «медленная», фаза, которая характеризовалась постепенным увеличением интенсивности флуоресцентного сигнала (рис. 3). Как показали результаты наших предыдущих исследований [23], такой характер изменения флуоресценции красителя может отражать диссипацию протонного градиента, в результате чего уменьшается способность синаптических везикул аккумулировать нейротрансмиттер.

Анализ дозозависимости эффекта аппликации глутамата выявил, что величина только первой («быстрой») фазы ответа прямо пропорциональна концентрации агониста (рис. 3). С повышением концентрации глутамата до 2–3 мМ амплитуда «всплеска» флуоресцентного сигнала возрастала, что может быть связано с вовлечением в процесс экзоцитоза большего количества синаптических везикул. Увеличение концентрации глутамата в данном случае приводило к уменьшению лаг-периода между двумя фазами. Вследствие этого при концентрации агониста 3 мМ после первичного увеличения интенсивности флуоресценции обратного

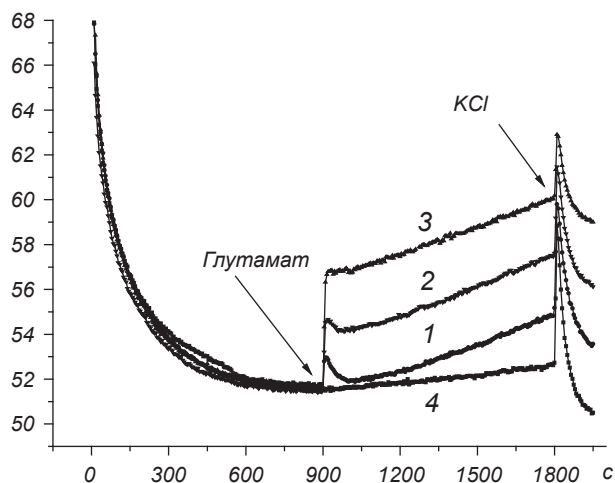


Рис. 3. Влияние глутамата в разных концентрациях (1–3 – 1, 2 и 3 мМ соответственно) на уровень ацидификации синаптических везикул нервных терминалей (4 – контроль, тестирование в буфере).

По оси абсцисс – время наблюдения, с; по оси ординат – интенсивность флуоресценции акридина оранжевого, отн. ед. Стрелками указаны моменты добавления глутамата и 30 мМ KCl.

Рис. 3. Вплив глутамату в різних концентраціях (1–3 – 1, 2 та 3 мМ відповідно) на рівень ацидифікації синаптичних везикул нервових терміналей (4 – контроль, тестування в буфері).

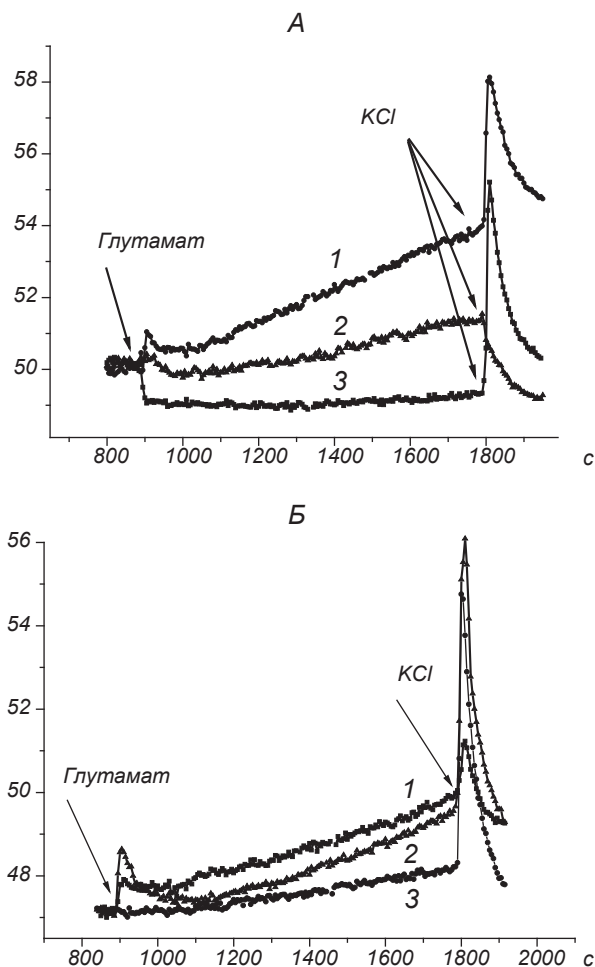
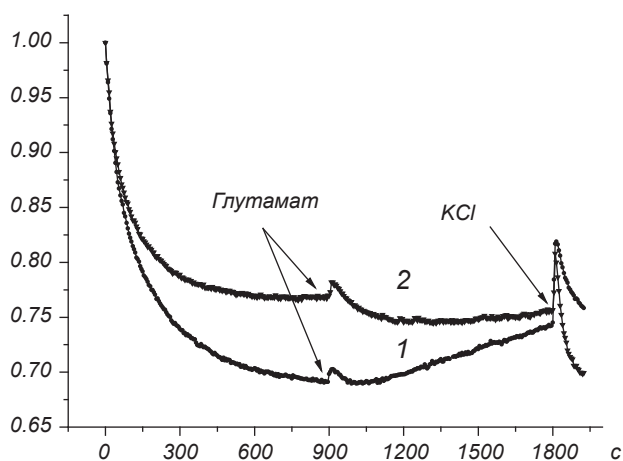


Рис. 4. Глутаматиндуцированные ответы нервных терминалей в условиях хелатирования ионов Ca^{2+} при помощи ЭГТА (А) и ингибирования кальциевой проводимости ионами Cd^{2+} (Б). Глутамат (1 мМ) добавлялся в суспензию нагруженных акридином оранжевым синапсом – контрольных (1) и предварительно инкубированных в присутствии 0.1 мМ ЭГТА (А, 2) или 25 мкМ CdCl_2 (Б, 2). В качестве контроля (3) использовался буфер. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Рис. 4. Глутаматіндуковані відповіді нервових терміналей в умовах хелатування іонів Ca^{2+} за допомогою ЭГТА (А) та інгібування кальцієвої провідності іонами Cd^{2+} (Б).

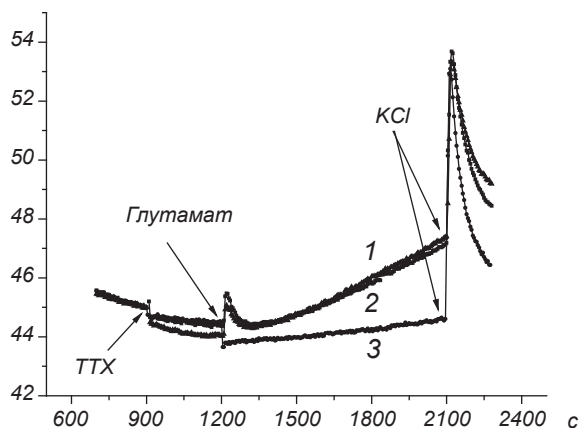
изменения флуоресцентного сигнала вообще не наблюдалось. Такая картина может быть результатом наложения двух разнонаправленных процессов – захвата зонда вновь образующимися везикулами и диссипации протонного градиента на мембране синапсом.

Влияние уровней внеклеточного кальция и натрия на «быструю» и «медленную» фазы глутаматиндуцированного ответа. Поскольку характер развития



Р и с. 5. Влияние аппликации 1 мМ глутамата на уровень acidификации синаптических везикул синапсом, предварительно инкубированных в натрий- (1) и холинсодержащей (2) средах. По оси абсцисс – время наблюдения, с; по оси ординат – нормированная интенсивность изменения флуоресценции акридина оранжевого, относительно интенсивности флуоресценции зонда в начальный момент времени ($F_0 - F/F_0$). Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Р и с. 5. Вплив аплікації 1 мМ глутамату на рівень acidифікації синаптичних везикул синапсом, попередньо інкубованих у натрій- (1) та холінвісному (2) середовищах.



Р и с. 6. Глутаматиндуцированные изменения уровня acidификации синаптических везикул синапсом в норме (1) и после добавления тетродотоксина – ТТХ (2). Стрелками указаны моменты добавления 1 мМ глутамата, 1 мкМ ТТХ и 30 мМ КСl. В качестве контроля (3) использовался буфер. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Р и с. 6. Глутаматіндуковані зміни рівня acidифікації синаптичних везикул синапсом у нормі (1) та після додавання тетродотоксину – ТТХ (2).

первой фазы ответа на аппликацию глутамата давал основание предполагать, что данная фаза отражает процесс экзоцитоза, логически оправданной была попытка выяснить роль кальция в развитии этого процесса. Эксперименты проводили в отсутствие в среде ионов Ca^{2+} , а также в условиях ингибирования кальциевой проводимости плазматической мембраны синапсом. Было показано, что в бескальциевой среде, содержащей в себе 100 мкМ ЭГТА, препараты синапсом не отвечали характерным «всплеском» флуоресцентного сигнала на аппликацию 1 мМ глутамата. Подобное отсутствие изменений флуоресцентного сигнала наблюдалось и при добавлении 30 мМ КСl (рис. 4, А). Аналогичная тенденция прослеживалась и при частичном ингибировании кальциевой проводимости под действием ионов Cd^{2+} (универсального блокатора кальциевых каналов) в сравнительно низких концентрациях. Преинкубация синапсом в среде, содержащей в себе 25 мкМ Cd^{2+} , существенно снижала величину ответа синапсом на аппликацию как глутамата, так и КСl (Б).

Анализируя природу второго («медленного») компонента глутаматиндуцированного ответа, мы тестировали влияние уровня внеклеточного натрия на исследуемый процесс. Принимался во внимание тот факт, что экзогенный глутамат стимулирует вход ионов Na^+ в пресинаптические структуры через глутаматный транспортер и ионные каналы глутаматных рецепторов. Было обнаружено, что при замене во внеклеточной среде 126 мМ NaCl холинхлоридом в эквимолярной концентрации развитие начальной фазы ответа на аппликацию глутамата не изменялось, однако отмечалось полное блокирование второго («медленного») компонента ответа (рис. 5). Аналогичная картина наблюдалась и при замене натрия N-метил-D-глюкаминном (данные не иллюстрируются). Чтобы определить, вовлечена ли в исследуемый процесс активация потенциалзависимых натриевых каналов, дальнейшие эксперименты были проведены в натрийсодержащей среде с добавлением 1 мкМ тетродотоксина (ТТХ). Как видно из рис. 6, блокирование ТТХ-чувствительных натриевых каналов не влияло на развитие второго компонента глутаматиндуцированного ответа.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что экзогенный глутамат вызывает в пресинаптических окончаниях развитие сложных процессов, в разной степени зависящих от внеклеточных уровней кальция и натрия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пресинаптические глутаматные рецепторы, согласно многочисленным литературным данным, играют важную роль в модуляции как возбуждающей, так и тормозной нейротрансдукции, регулируя тем самым активность нейронных сетей мозга [4]. Наличие на мембранах пресинаптических терминалей ГАМК-эргических нейронов глутаматных рецепторов практически всех типов предполагает непосредственное участие этих рецепторов в регуляции секреторного процесса [5, 8, 12, 24]. Наша работа, которая выполнялась на изолированных пресинаптических терминалях, полученных из мозга крыс, имела целью выяснение механизмов, лежащих в основе модуляции процесса нейросекреции в ответ на аппликацию экзогенного глутамата.

Анализ результатов, полученных в экспериментах с использованием меченой ГАМК и флуоресцентного зонда АО, показал, что экзогенный глутамат индуцирует в пресинаптических структурах развитие сложных процессов, зависящих от присутствия во внеклеточной среде ионов кальция и натрия. Такие зависимости, надо полагать, обусловлены тем, что активация основных мишеней для действия глутамата – пресинаптических глутаматных рецепторов и глутаматных транспортеров – сопряжена с входом кальция и натрия внутрь нервной терминали. Действие кальция инициирует первичный быстрый ответ терминали на аппликацию глутамата. Этот ответ, по всей видимости, представляет собой процесс экзоцитоза. Основанием для такого вывода послужили результаты обоих вариантов наших экспериментов – с применением меченой ГАМК и АО. Так, результаты экспериментов первого типа четко показали, что глутаматиндуцированное высвобождение ГАМК из нервных окончаний гиппокампа происходит исключительно из синаптических везикул, но не из цитозольного пула. На это указывало отсутствие какого-либо влияния специфического блокатора ГАМК-транспортеров (NO-711) на общее количество медиатора, высвобождаемое из терминалей в ответ на аппликацию глутамата.

Полученные результаты коррелируют с данными флуоресцентных измерений, согласно которым глутамат стимулирует быстрый выброс протонов из синаптических везикул. Полное сходство характера кальцийчувствительного ответа на действие глутамата и калия в высокой концентрации указывает на то, что глутамат индуцирует именно процесс экзоцитоза. Если пусковым механизмом КСl-индуциру-

емого экзоцитоза является вход ионов Ca^{2+} вследствие деполяризации плазматической мембраны, то пусковым механизмом первой фазы глутаматиндуцированного ответа, как можно полагать, является локальный вход кальция через ионные каналы глутаматных рецепторов. В первую очередь речь идет о «быстрых» рецепторах АМПА/каинатного типа. Их участие в модуляции ГАМК-эргической нейротрансдукции было показано в ряде исследований [6, 12, 25]; высказывается даже предположение об исключительной роли каинатных рецепторов в модуляции процесса высвобождения ГАМК из пресинаптической терминали [11]. Однако значительное ингибирование начальной фазы глутаматиндуцированного ответа наблюдалось и при добавлении в среду Cd^{2+} . Кадмий является универсальным блокатором потенциалзависимых кальциевых каналов всех типов и, согласно данным Майера [26], блокирует каналы НМДА- (но не каинатных) рецепторов. Чувствительность «быстрой» фазы ответа к Cd^{2+} может указывать на вовлечение потенциалзависимых кальциевых каналов в инициацию экзоцитоза. Нельзя также полностью исключить возможность участия в данном процессе и каналов НМДА-рецепторов; эти каналы сами по себе также могут обеспечивать в значительной степени вход кальция в терминаль. Достаточная для их активации степень деполяризации плазматической мембраны может быть достигнута в результате переноса глутамата электрогенными натрийзависимыми транспортерами [27].

Что же касается второй фазы глутаматиндуцированного ответа, то она оказалась крайне чувствительной к присутствию во внеклеточной среде ионов Na^+ : замена натрия холином или N-метил-D-глюкамином полностью блокировала развитие данной фазы. Подобную зависимость от наличия/отсутствия натрия отмечали при изучении влияния глутамата на секрецию ГАМК из терминалей, полученных из коры головного мозга крыс [27], и из амакриновых клеток сетчатки цыпленка [28], а также эффекта аппликации НМДА по отношению к секреции ГАМК, глутамата и аспартата из терминалей гиппокампа мозга крыс [29]. Оказалось, что 15-минутная обработка культуры гиппокампальных нейронов глутаматом или НМДА вызывала существенное повышение цитозольной концентрации натрия (от 6–8 до 30–45 мМ [30]). Помимо ионотропных глутаматных рецепторов (которые, как известно, обладают высокой проводимостью для ионов натрия), натрий может проникать в клетку вследствие работы натрийзависимых глутаматных транспорте-

ров, через потенциалзависимые натриевые каналы, а также через натрий-кальциевые и натрий-протонные обменники. В наших экспериментах развитие второго (натриевого) компонента было нечувствительно к присутствию ТТХ. Данный факт, по-видимому, указывает на несущественную роль потенциалзависимых натриевых каналов в этом процессе.

Анализируя природу второго компонента глутаматиндуцированного ответа препаратов синаптосом, с которым связан постепенный медленный выход протонов из синаптических везикул, можно допустить, что такой процесс может отражать асинхронный спонтанный экзоцитоз или/и диссипацию протонного градиента на мембране синаптических везикул. Одной из причин такой диссипации протонного градиента может являться снижение функциональной эффективности протонной помпы везикул вследствие падения уровня АТФ в клетке. Особое падение уровня АТФ может быть вызвано каскадом внутриклеточных событий, которые инициируются увеличением цитозольной концентрации Na^+ с последующим снижением натриевого градиента на плазмолемме, усиленной работой Na^+, K^+ -АТФазы и, как результат, ускоренным потреблением АТФ [31]. Другой причиной снижения уровня АТФ может быть глутаматиндуцированная дисфункция митохондрий вследствие избыточной аккумуляции кальция этими органеллами [32, 33]. Таким образом, нарушение натриевого и кальциевого гомеостаза в результате активации пресинаптических глутаматных рецепторов (а возможно, и транспортеров) может быть ключевой причиной изменения функционального состояния синаптических везикул. Наиболее важным следствием диссипации протонного градиента является потеря синаптическими везикулами способности аккумулировать нейротрансмиттер (ГАМК).

Может ли выход рН-чувствительного красителя АО (а следовательно, и протонов) из синаптических везикул быть результатом асинхронного медленно развивающегося процесса экзоцитоза? Согласно данным многочисленных исследований последних лет, в клетке могут реализовываться два типа кальцийзависимого экзоцитоза – синхронный и асинхронный. Активация синхронного экзоцитоза происходит за счет входа внеклеточного Ca^{2+} при активации потенциалзависимых кальциевых каналов, а асинхронного – за счет выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо при активации рецепторов. Как было показано, реверсное функционирование натрий-кальциевого обменника, которое может запу-

скаться увеличением $[\text{Na}^+]_i$ во время активации глутаматных рецепторов, вносит существенный вклад в первоначальное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [34]. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в пресинаптической структуре, в свою очередь, вызывает дополнительное высвобождение кальция из внутриклеточных депо через рианодинчувствительные каналы эндоплазматического ретикула [35, 36]. Согласно одной из гипотез, именно увеличение концентрации Ca^{2+} в пресинапсе лежит в основе развития пресинаптической долговременной потенциации [37]. Кальций активирует кальций-кальмодулинчувствительную аденилатциклазу, а это ведет к увеличению уровня цАМФ, активации протеинкиназы А и продолжительному повышению интенсивности высвобождения нейротрансмиттеров из нервных терминалей, т. е. в результате – к модуляции процесса экзоцитоза [1, 38].

Таким образом, наблюдаемый нами двухфазный процесс глутаматиндуцированного высвобождения протонов из синаптических везикул нервных терминалей мозга крыс коррелирует с двухступенчатым повышением концентрации кальция под воздействием глутамата, что было описано ранее в литературе [33]. Однако если характер (кинетика ответа и зависимость от Ca^{2+}) первой («быстрой») фазы дает основание идентифицировать ее как стимулированный экзоцитоз, то суть процессов, определяющих последующий медленный выход протонов из синаптических везикул, гораздо менее ясна. Природа второго натрийзависимого компонента ответа на действие глутамата на синаптосомы может быть установлена только в ходе дальнейших исследований.

А. С. Тарасенко¹, О. О. Крупко¹, Н. Г. Гіммельрейх¹

МОДУЛЯЦІЯ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОГО ПРОЦЕСУ В НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЯХ ІЗ МОЗКУ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ЕКЗОГЕННОГО ГЛУТАМАТУ

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Ми вивчали внутрішньоклітинні процеси, які відбуваються в нервових закінченнях нейронів головного мозку щурів у відповідь на аплікацію екзогенного глутамату. Використовуючи рН-чутливий флуоресцентний зонд акридин оранжевий (АО) та мічену гамма-аміномасляну кислоту ($[^3\text{H}]$ ГАМК), оцінювали вплив аплікації глутамату на рівень ацидифікації синаптичних везикул та вивільнення ГАМК із нервних терміналей (синаптосом), отриманих з ткани-

ни гіпокампа. Результати експериментів показали, що глутамат дозозалежно стимулював вивільнення $[^3\text{H}]$ ГАМК з нервових терміналей, після чого спостерігалось зворотнє захоплення даного нейропередача. Селективний блокатор транспортерів ГАМК (NO-711) повністю блокував захоплення нейротрансмітера, але не впливав на вивільнення останнього; дане спостереження вказує на те, що глутамат-індукований викид ГАМК відбувався з везикулярного, а не з цитозольного пулу. Підтвердженням стимуляції глутаматом процесу екзоцитозу стали результати експериментів з АО, в яких були отримані свідчення двофазності згаданого процесу. Перша фаза, що відображувала, видимо, кальційіндукований екзоцитоз, виглядала як „спалах” флуоресцентного сигналу, характерний для відповіді синапсом на дію KCl у деполаризуючих концентраціях. Обидві фази відповіді повністю блокувались або істотно пригнічувались в умовах безкальцієвого середовища чи в присутності 25 мкМ Cd^{2+} . Друга („повільна”) фаза відповіді розвивалася після певного лаг-періоду і характеризувалася поступовим збільшенням інтенсивності флуоресцентного сигналу. Ця фаза виявилася повністю залежною від присутності натрію в позаклітинному середовищі та повністю блокувалася при заміні натрію холіном або N-метил-D-глюкаміном. Зроблено припущення, що друга фаза відповіді може відображувати або спонтанний нестимульований екзоцитоз, або дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул, індуковану входом іонів Na^+ у нервові закінчення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. Citri and R. C. Malenka, “Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms,” *Neuropsychopharmacology*, **33**, 18-41 (2008).
2. E. S. Vizi, “Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system,” *Pharmacol. Rev.*, **52**, No. 1, 63-90 (2000).
3. S. Z. Langer, “Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release,” *Neurochem. Int.*, **52**, 26-30 (2008).
4. P. S. Pinheiro and Ch. Mulle, “Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action,” *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 423-436 (2008).
5. M. Glitsch, “Calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors triggers GABA release at interneuron-purkinje cell synapse in rat cerebellum,” *Neuroscience*, **151**, 403-409 (2008).
6. S. S. Mathew, L. Pozzo-Miller, and J. J. Hablitz, “Kainate modulates presynaptic GABA release from two vesicle pools,” *J. Neurosci.*, **28**, 725-731 (2008).
7. A. Rodrigez-Moreno and T. S. Sihra, “Kainate receptors with a metabotropic modus operandi,” *Trends Neurosci.*, **30**, 630-637 (2007).
8. B. Halabiasky, D. Friedman, M. Radojicic, and B. W. Strowbridge, “Calcium influx through NMDA receptors directly evokes GABA release in olfactory bulb granule cells,” *J. Neurosci.*, **20**, 5124-5134 (2000).
9. L. Jiang, J. Xu, M. Nedergaard, and J. Kang, “A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses,” *Neuron*, **30**, 503-513 (2001).
10. M. Ren, Y. Yoshimura, N. Takada, et al., “Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons,” *Science*, **316**, 758-761 (2007).
11. R. Cossart, R. Tyzio, C. Dinocourt, et al., “Presynaptic kainite receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons,” *Neuron*, **29**, 497-508 (2001).
12. M. L. Fiszman, F. Erdelyi, G. Szabo, and S. Vicini, “Presynaptic AMPA and kainate receptors increase the size of GABAergic terminals and enhance GABA release,” *Neuropharmacology*, **52**, 1631-1640 (2007).
13. S. J. Liu and P. Lachamp, “The activation of excitatory glutamate receptors evokes a long-lasting increase in the release of GABA from cerebellar stellate cells,” *J. Neurosci.*, **26**, 9332-9339 (2006).
14. S. J. Liu, “Biphasic modulation of GABA release from stellate cells by glutamatergic receptor subtypes,” *J. Neurophysiol.*, **98**, 550-556 (2007).
15. A. J. Cochilla and S. Alford, “Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release,” *Neuron*, **20**, No. 5, 1007-1016 (1998).
16. S. J. Mitchell and R. A. Silver, “Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs,” *Nature*, **404**, 498-502 (2000).
17. C. W. Cotman, “Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions,” *Methods Enzymol.*, **31**, 445-452 (1974).
18. E. Larson, B. Howlett, and A. Jagendorf, “Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination,” *Anal. Biochem.*, **155**, 243-248 (1986).
19. F. Zoccarato, L. Cavallin, and F. Alexandre, “The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes,” *J. Neurochem.*, **72**, No. 2, 625-633 (1999).
20. В. И. Мельник, С. Ю. Титов, Р. Н. Глебов, “Кислый компармент и латентная система ацидификации в синапсоммах мозга”, *Нейрохимия*, **7**, № 3, 337-347 (1988).
21. L. G. Storchak, N. G. Pozdnyakova, and N. H. Himmelreich, “Differential effect of protein kinase inhibitors on calcium-dependent and calcium-independent $[^{14}\text{C}]$ GABA release from rat brain synaptosomes,” *Neuroscience*, **85**, 989-997 (1998).
22. T. A. Ryan and H. Reuter, “Measurements of vesicle recycling in central neurons,” *News Physiol. Sci.*, **16**, 10-14 (2001).
23. A. S. Tarasenko, O. G. Kostrzhevskaya, L. G. Storchak, et al., “Phenylarsine oxide is able to dissipate synaptic vesicle acidic pool,” *Neurochem. Int.*, **46**, 541-550 (2005).
24. P. V. Belan and P. G. Kostyuk, “Glutamate-receptor-induced modulation of GABAergic synaptic transmission in the hippocampus,” *Pflügers Arch.*, **444**, No. 1, 26-37 (2002).
25. J. Lerma, “Kainate receptor physiology,” *Current. Opin. Pharmacol.*, **6**, 89-97 (2006).
26. M. L. Mayer, L. Viklicky Jr, and G. L. Westbrook, “Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurons,” *J. Physiol.*, **415**, 329-350 (1989).
27. G. Bonanno, A. Pittaluga, E. Fedele, et al., “Glutamic acid and γ -aminobutyric acid modulate each other’s release through heterocarriers sited on the axon terminals of rat brain,” *J. Neurochem.*, **61**, 222-230 (1993).
28. K. C. Calaza and P. F. Gardino, “Transporter-mediated GABA release in the retina: role of excitatory amino acids and dopamine,” *Neurochem. Int.*, **49**, 769-777 (2006).
29. A. I. Breukel, E. Besselsen, F. H. Lopes Da Silva, and W. E. Ghijsen, “A presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptor in rat hippocampus modulating amino acid

- release from a cytoplasmic pool,” *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 106-114 (1998).
30. V. G. Pinelis, M. Segal, V. Greenberger, and B. I. Khodorov, “Changes in cytosolic sodium caused by a toxic glutamate treatment of cultured hippocampal neurons,” *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **32**, 475-482 (1994).
31. D. Nicholls and D. Attwell, “The release and uptake of excitatory amino acids,” *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 462-468 (1990).
32. M. W. Ward, A. C. Rego, B. G. Frenguelli, and D. G. Nicholls, “Mitochondrial membrane potential and glutamate neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells,” *J. Neurosci.*, **20**, 7208-7219 (2000).
33. B. Khodorov, “Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **86**, 279-351 (2004).
34. K. R. Hoyt, S. R. Arden, E. Aizenman, and I. J. Reynolds, “Reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange contributes to glutamate-induced intracellular Ca^{2+} concentration increases in cultured rat forebrain neurons,” *Mol. Pharmacol.*, **53**, 742-749 (1998).
35. S. Litwin, O. Kohmoto, A. J. Levi, et al., “Evidence that reverse Na-Ca exchange can trigger SR calcium release,” *Ann. New York Acad. Sci.*, **779**, 451-463 (1996).
36. G. Sharma and S. Vijayaraghavan, “Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing,” *Neuron*, **38**, 929-939 (2003).
37. R. A. Nicoll and R. C. Malenka, “Contrasting properties of two forms of long term potentiation in the hippocampus,” *Nature*, **377**, 115-118 (1995).
38. R. A. Nicoll and D. Schmitz, “Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses,” *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 863-876 (2005).