

УДК 577.122

А.Ю.Шеянова (5 курс, каф. БФ), М.Н.Богданова, асп., ПИЯФ РАН

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫДЕЛЕННЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ (СИНАПТОСОМ) ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ

В настоящее время имеется много данных о механизмах передачи сигналов в нервной клетке, однако эти процессы остаются недостаточно изученными на молекулярном уровне. Исследования процессов передачи сигналов в нервной клетке, а также белков, принимающих участие в этих процессах, являются актуальными, так как нарушения в работе этих систем могут вызывать тяжелые хронические заболевания (эпилепсия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера) [1]. Поэтому эти исследования могут иметь практическое значение в медицине и фармакологии.

Были поставлены следующие задачи: освоить методы выделения синапсосом и разработать методику анализа высвобождения аминокислотных нейромедиаторов из синапсосом; исследовать действие синтетического пептида P2, имитирующего второй иммуноглобулин-подобный участок белка NCAM, на выброс нейромедиатора. Исследования велись на мозге крысы.

Методика исследования нейромедиаторов очень сложна, так как они содержатся в мозге в малых количествах, поэтому выделить для исследования определенную медиаторную структуру нелегко. Данные исследования стали возможны после разработки методики выделения нервных окончаний. При осторожном разрушении ткани мозга путём гомогенизации в растворе сахарозы многие нервные окончания отрываются от своих аксонов и образуют особые замкнутые частицы, названные "синапсосомами", которые содержат механизмы синтеза, хранения, высвобождения и инактивации медиатора. [2] Данная методика широко используется в нашей лаборатории, но до последнего времени мы изучали лишь процессы, протекающие "внутри" выделенных нервных окончаний, т.е. процессы, связанные с функционированием таких сигнальных белков головного мозга как GAP-43 и BASP1. Эти белки являются одними из ключевых регуляторных белков нервных окончаний. При развитии нервной системы белки GAP-43 и BASP1 играют важнейшую роль в росте нейритов и "навигации" их конусов роста, а так же участвуют в поддержании пластичности нервной системы взрослого организма – процессов, лежащих в основе обучения и формирования памяти. Также белок GAP-43 принимает участие в секреции нейромедиаторов SCCV-пузырьков (small cleare-cored vesicles) быстрой синаптической передачи [3]. Однако функции этих белков могут быть окончательно установлены только при условии исследования их роли в завершающем этапе передачи сигнала – высвобождении нейромедиатора.

Перед нами стояла задача разработать методику анализа изменения концентраций аминокислотных нейромедиаторов методом тонкослойной хроматографии. Для этого были освоены стандартные методы тонкослойной хроматографии, подобраны оптимальные условия для разделения и анализа смеси аминокислот (глутамата, глутамина и глицина). Наилучшее разделение достигалось при последовательном проведении хроматографии в системах растворителей этанол-аммиак (7:3 об./об.) и бутанол-1-уксусная кислота-вода (8:2:2 об./об./об.).

Выделенные синапсомы инкубировались в буфере Кребса с различной концентрацией ионов K^+ , после чего материал центрифугировался при 12,500 g в течение 10 минут. Надосадочная жидкость, полученная в результате центрифугирования, содержит вышедший в среду нейромедиатор. Наличие солей в надосадочной жидкости мешает проведению тонкослойной хроматографии, поэтому для подготовки к тонкослойной хроматографии надосадочную жидкость очищали от солей методом ионообменной хроматографии с использованием смолы AG 50W-X12 200-400 mesh. Изменение выхода нейромедиатора при повышении концентрации ионов калия в буфере Кребса (при сохранении ионной силы раствора) представляет собой возрастающую зависимость с насыщением. Это согласуется с результатами, представленными в [4], что доказывает применимость метода тонкослойной хроматографии для качественного анализа выхода нейромедиаторов.

Нами было исследовано влияние на выход нейромедиатора P2 пептида, который ингибирует клеточную адгезию, индуцирует рост нейритов и ингибирует апоптотические процессы в некоторых нейронах [5]. Недавно появились данные, что P2 пептид увеличивает фосфорилирование белка GAP-43 и поэтому может влиять на выброс нейромедиатора. По данным ВЭЖХ, проведенной с помощью коллег из Центра Биохимических Исследований, в результате деполяризации увеличивается выброс глутамата, глутамина и серина. Действие P2 пептида на синапсомы вызывает снижение концентраций аминокислот в анализируемых жидкостях. Данный факт можно объяснить следующим образом: как было обнаружено, P2-пептид увеличивает фосфорилирование белка GAP-43 по Ser41, а белок GAP-43 в фосфорилированной форме способен стабилизировать актиновые филаменты, что может затруднять выброс нейромедиатора.

Данные методические разработки будут использованы для выявления роли сигнальных белков GAP-43 и BASP1 в процессах регуляции выброса нейромедиатора. Так, в ближайшем будущем предполагается исследовать роль протеолитического фрагмента белка GAP-43 (1-40) в регуляции процесса освобождения нервными окончаниями аминокислотных нейромедиаторов. Также планируется продолжить эксперименты с P2 пептидом.

Таким образом, качественные изменения в выбросе нейромедиаторов можно исследовать методом тонкослойной хроматографии. Обнаружена тенденция к снижению выброса нейромедиатора под действием синтетического пептида P2, имитирующего второй иммуноглобулин-подобный участок белка NCAM.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Любимов Я.Е. (2003). Электрофизиологическое исследование влияния кортикотропин-релизинг фактора на приспособительные реакции нейронов мозга. Авт. дис. кан. биол. наук. СПб.
2. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Heath J.W., Kid G.J., Rostas J.A. (1986). *Brain Res.* 372, 115-129.
3. Oestreicher A.B., De Graan P.N., Gispen W.H., Verhaagen J., Schrama L.H. (1997). *Prog. Neurobiol.* 53, 627-686.
4. James B. Phillips Jr., Brian M. Cox (1997). *J Neurosci Methods* 77:211-20.
5. Pedersen M.V., Kohler L.B., Ditlevsen D.K., Li S., Berezin V., Bock E. (2004). *J Neurosci Res.* 75:55-65.