

- homeostasis: the need for more information and new tools // *Neurobiol. Ageing*.— 1987.— 8.— P. 348—350.
27. Nachshen D. A. The early time course of potassium-stimulated calcium uptake in presynaptic nerve-terminals isolated from rat brain // *J. Physiol.*— 1985.— 361.— P. 251—268.
 28. Vicholls D., Akerman K. Mitochondrial calcium transport // *Biochem. et biophys. acta.*— 1982.— 683.— P. 57—88.
 29. Nowycky M. C., Fox A. P., Tsien R. W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity // *Nature*.— 1985.— 316.— P. 440—443.
 30. Peterson C., Gibson G. E. Aging and 3,4-diaminopyridine alter synaptosomal calcium uptake // *J. Biol. Chem.*— 1983.— 258.— P. 11482—11486.
 31. Peterson C., Nicholls D., Gibson G. E. Subsynaptosomal calcium distribution during aging and 3,4-diaminopyridine treatment // *Neurobiol. Ageing*.— 1985.— 6.— P. 297—304.
 33. Sastrústegui J., Martínez-Serrano A., Blanco P., Bogónez E. Influence of ageing on the compartmentation of calcium within nerve endings during depolarization and effects on pyruvate dehydrogenase dephosphorylation // *Proc. 7th Weiner Symp. «The Theoretical Basis of Aging Research»*.— In press.
 34. Schanne F. A. X., Kane A. B., Young E. E., Farber J. L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway // *Science*.— 1979.— 206.— P. 700—702.
 35. Smith S. J., Augustine G. J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release // *Trends Neurosci.*— 1988.— 11.— P. 458—464.
 36. Suszkiw J. B., O'Leary M. E., Murawsky M. M., Wang T. Presynaptic calcium channels in rat cortical synaptosomes: fast-kinetics of phasic calcium influx, channel inactivation, and relationship to nitrendipine receptors // *J. Neurosci.*— 1986.— 6.— P. 1349—1357.
 37. Vitórica J., Sastrústegui J. The role of ADP in the modulation of the calcium-efflux pathways in rat brain mitochondria // *Biochem. J.*— 1985.— 225.— P. 41—49.
 38. Vitórica J., Clark A., Machado A., Sastrústegui J. Impairment of glutamate uptake and absence of alterations in the energytransducing ability of old rat brain mitochondria // *Mech. Ageing. Develop.*— 1985.— 29.— P. 255—266.
 39. Vitórica J., Sastrústegui J. Involvement of mitochondria in the age-dependent decrease in calcium uptake in rat brain synaptosomes // *Brain Res.*— 1986.— 378.— P. 36—48.
 40. Vitórica J., Sastrústegui J. The influence of age on the calcium efflux pathway and matrix calcium buffering power in brain mitochondria // *Biochem. et biophys. acta.*— 1986.— 851.— P. 209—216.
 41. Williamson J. R., Williams R. J., Coll K. E., Thomas A. P. Cytosolic free Ca^{2+} concentration and intracellular calcium distribution of Ca^{2+} -tolerant isolated heart cells // *J. Biol. Chem.*— 1983.— 258.— P. 13411—13414.

Центр молекулярной биологии
Мадрид. ун-та, Испания

Материал поступил
в редакцию 30.02.90

УДК 577.45:577.24

А. Р. Армениян, Л. Н. Аракелян, Г. В. Априкян

Захват и K^+ -вызванное высвобождение Н-норадреналина в мезодизэнцефальных синапсах белых крыс при старении. Роль N-ацетил- L -аспарагиновой кислоты

При старении выраженные изменения возникают в механизме адренергической передачи. Снижается активность ферментов, катализирующих синтез веществ-медиаторов, в частности катехоламинов, в определенных структурах головного мозга [8, 11, 20]. С возрастом уменьшается число рецепторов мозга, чувствительных к катехоламинам, изменяется их конформация, что и обуславливает снижение реакционной способности клетки и повышение чувствительности нейронов к гуморальным факторам [5, 15]. Уменьшается число мозговых синапсов [13]. Изменения обмена медиаторных веществ при старении, по мнению Gibson и соавт. [12], обусловлены нарушением кальциевого равновесия.

По немногочисленным имеющимся в литературе данным, захват и высвобождение катехоламинов, в частности норадреналина (НА), в

© А. Р. АРМЕЯН, Л. Н. АРАКЕЛЯН, Г. В. АПРИКЯН, 1990.

срезах мозга ослабляются конкретно в синапсах, содержащих об ослаблении в м и вызванного высвобождения аспарагиновой (Ас) аминокислоты (2) и Гекчан и Априкян [1] кислота (НААК) подавляет вызванное высвобождение Ас ловного мозга молодых и данных авторы предполагают, что захват и высвобождение

НААК — первая, обнаруженная [19]. Затем были и соответствующий пептид, в мозге количество в субклеточном фракционировании синапсах [17]. Синапс об участии ее в синаптической НААК к спинномозговому цистернальному и внутриклеточному дающий эффект аспартата, вещество ингибирует связывание рецепторами [7]. Имеют глутамат, повышает количество [6]. Несмотря на то, что НААК в нас к изучению роли N -ацетил- K^+ -вызванному высвобождению в синапсах при старении

Методика

В экспериментах использовали линии Вистар, содержащихся в условиях. Синапсомы из мезодизэнцефальных зон инкубировали при наличии в инкубационной среде 1 мМ проводили со скоростью 1 мл/мин. Исследования описаны ранее [3]. Радиоактивности суперфузионной фракции. При изучении захвата 3H -НААК, содержащую $2,5 \cdot 10^{-8}$ М, фильтры (диаметр пор 0,65 мкм). Для учета неспецифического захвата использовали при 0°. Радиоактивность синапсомы и 10 мл сцинтилляционной жидкости и счетчика «Intertechnique» в буфер pH 7,2—7,4 со сле. KH_2PO_4 — 1,2; $MgSO_4$ — 1,2; $NaCl$ — 1,2; бавляли ипризид, ($6 \cdot 10^{-4}$ моль/л) «Sigma» (США). В среде, обогащенной молярным замещением $NaCl$ на 1 М «Amersham» (Англия), НААК [18].

Результаты и их обсуждение

Известно, что прекращение высвобождения и удаления из мезодизэнцефального транспортного механизма, — обратного захвата.

срезам мозга ослабляются с возрастом [16]. Сведений о судьбе НА конкретно в синапсах мозга в возрастном аспекте нет. Есть сообщения об ослаблении в мозговых синапсах при старении захвата и вызванного высвобождения нейромедиаторных аминокислот, в частности аспарагиновой (Асп), глутаминовой (Глу) кислот и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [1, 2, 4, 21]. Априкян и соавт. [1, 2] и Гекчян и Априкян [4] показали, что *N*-ацетил-*L*-аспарагиновая кислота (НААК) подавляет захват и одновременно стимулирует вызванное высвобождение Асп и Глу (но не ГАМК) в синапсах головного мозга молодых и старых крыс одинаково. На основании этих данных авторы предполагают, что НААК является природным регулятором захвата и высвобождения этих нейромедиаторных аминокислот.

НААК — первая, обнаруженная в мозгу ацетилированная аминокислота [19]. Затем были обнаружены *N*-ацетилглутаминовая кислота и соответствующий пептид — *N*-ацетиласпартилглутамат. В сером веществе мозга количество НААК в два раза больше, чем в белом. При субклеточном фракционировании НААК обнаруживается в цитозоле и синапсах [17]. Синапсомная локализация НААК свидетельствует об участии ее в синаптических процессах. Ионотропическая аппликация НААК к спинномозговым нейронам неэффективна [10], а внутрицистернальное и внутривентрикулярное введение ее подавляет возбуждающий эффект аспартата и глутамата [9]. Показано, что это вещество ингибирует связывание аспартата с постсинаптическими рецепторами [7]. Имеются сведения, что НААК, как аспартат и глутамат, повышает количество ЦАМФ и ЦГМФ в коре больших полушарий [6]. Несмотря на многочисленные исследования, физиологическая функция НААК в мозгу не достаточно выяснена, что побудило нас к изучению роли *N*-ацетил-*L*-аспарагиновой кислоты в захвате и K^+ -вызванном высвобождении 3H -норадреналина в мезодиэнцефальных синапсах при старении.

Методика

В экспериментах использовали зрелых (4–6 мес) и старых (24 мес) крыс-самцов линии Вистар, содержащихся на одинаковом пищевом рационе и в идентичных условиях. Синапсы из мезодиэнцефальных областей выделяли по методу Хайоша [14], инкубировали при наличии в инкубационной среде $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л 3H -НА. Суперфузию проводили со скоростью 1 мл/мин. Пробы брали каждые 30 с. Подробно методика исследования описана ранее [3]. Меру высвобождения 3H -НА оценивали отношением радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся общей радиоактивности синапсом. При изучении захвата 3H -НА инкубированную суспензию (0,14 мг/белка $\pm 0,01$ мг белка), содержащую $2,5 \cdot 10^{-8}$ моль/л 3H -НА и НААК, переносили на миллипоровые фильтры (диаметр пор 0,65 мкм, тип ДА) фирмы «Millipore» (США) и промывали. Для учета неспецифического захвата проводили параллельную инкубацию синапсом при 0°. Радиоактивность синапсом и среды измеряли (после добавления 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея) с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика «Intertechnique» SL-4221 (Франция). Использовали Krebs-бикарбонатный буфер pH 7,2–7,4 со следующим составом (ммоль/л): NaCl — 113; KCl — 4,75; KH_2PO_4 — 1,2; $MgSO_4$ — 1,2; $NaHCO_3$ — 25; $CaCl_2$ — 2,5; глюкоза — 11,5. В буфер добавляли ипразид ($6 \cdot 10^{-4}$ моль/л), аскорбиновую кислоту ($1,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л) фирмы «Sigma» (США). В среде, обогащенной K^+ (40 ммоль/л), изотоничность достигали изомолярным замещением NaCl на KCl. Использовали 3H -НА (35 Ки·ммоль $^{-1}$ ·л $^{-1}$) фирмы «Amersham» (Англия), НААК — фирмы «Sigma». Белок определяли по методу Скопеса [18].

Результаты и их обсуждение

Известно, что прекращение действия НА происходит в результате его распада и удаления из мест контакта с рецепторами с помощью специального транспортного механизма, имеющегося в нервных окончаниях, — обратного захвата. Обратный захват НА является также важ-

нейшим источником пополнения запасов его в нервных окончаниях. Следовательно, ослабление захвата может привести к удлинению физиологического действия высвобожденного медиатора, а также снижению депонирования НА в везикулах.

В первой серии опытов мы изучали захват ^3H -НА мезодиэнцефальными синапсами у зрелых и старых крыс. Как видно из рис. 1, захват ^3H -НА у старых крыс значительно ослаблен. В течение 5, 10 и 15 мин инкубации синапсом с ^3H -НА захват его синапсами у

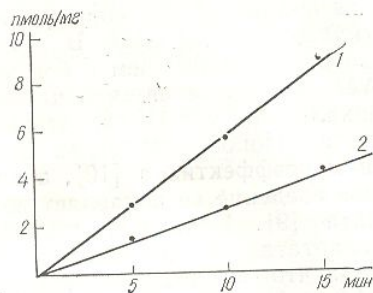
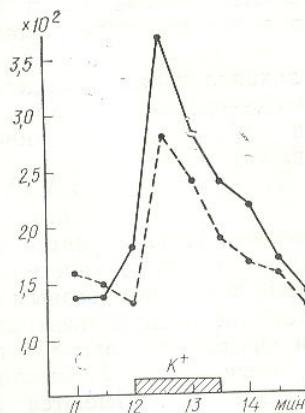


Рис. 1. Захват ^3H -норадреналина (НА) мезодиэнцефальными синапсами взрослых (1) и старых (2) крыс. По оси абсцисс — время инкубации, по оси ординат — содержание ^3H -НА в белке. Средние данные 8–9 опытов. Стандартное отклонение не более 10 %.

Рис. 2. Высвобождение ^3H -норадреналина (НА), вызванное K^+ (40 ммоль/л), из мезодиэнцефальных синапсов взрослых (1) и старых (2) крыс. По оси абсцисс — время суперфузии, по оси ординат — мера высвобождения ^3H -НА. Средние данные 5–7 опытов. Стандартное отклонение не более 10 %.



старых крыс по сравнению со взрослыми подавляется на 63, 63 и 53 % соответственно. Наши исследования по изучению влияния НААК на захват ^3H -НА показали, что ААК в концентрациях 10^{-4} – $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л не влияет на захват ^3H -НА мезодиэнцефальными синапсами у зрелых крыс.

В следующей серии экспериментов изучали высвобождение ^3H -НА, вызванное K^+ , из мезодиэнцефальных синапсов у взрослых и старых животных. Показано, что у взрослых крыс ионы калия стимулируют высвобождение ^3H -НА из синапсом на 164 % по сравнению с его исходным содержанием, а у старых крыс — всего на 86 % (рис. 2). Это указывает на то, что в старческом возрасте вызванное высвобождение НА значительно снижается. Но, как видно из рисунка, спонтанное высвобождение ^3H -НА, наоборот, несколько усиливается.

При K^+ -стимулировании синапсом зрелых крыс в условиях содержания в инкубационной среде НААК наблюдалось подавление высвобождения из них ^3H -НА. НААК в концентрации 10^{-4} моль/л подавлял K^+ -вызванное высвобождение на 36 %, при концентрации 10^{-3} моль/л ее тормозящий эффект значительно возрастал — 64 % (рис. 3, а). Интересно отметить, что оптимальная концентрация НААК, влияющая на захват и высвобождение нейромедиаторных аминокислот, составляет 10^{-3} моль/л [2, 4].

Использованные нами концентрации НААК не вызвали достоверных изменений K^+ -вызванного высвобождения ^3H -НА из мезодиэнцефальных синапсов старых крыс. Однако НААК изменяет картину K^+ -вызванного высвобождения ^3H -НА: эффект K^+ сохраняется в синапсах долго, в течение всего периода инкубации в среде, содержащей ионы K , и после промывания синапсом нормальным буфером высвобождение ^3H -НА не доходит до исходного значения (рис. 3, б).

В пресинаптической регуляции является механизм отрицательной обратной связи с α -адренорецепторами. В пресинаптических терминалях нейронов наряду с α -адренорецепторами участвующие в механизме обратной связи к дофамину, мускарину, норадреналину, которые регулируют обратную связь. На основа

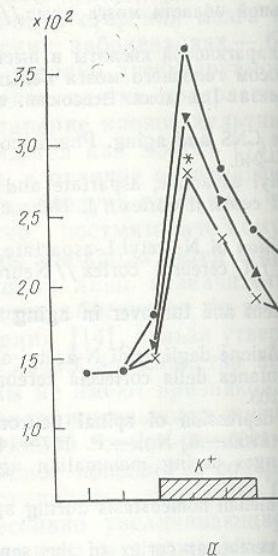


Рис. 3. Влияние N-ацетил-L-аспарата (НААК) на захват и высвобождение ^3H -норадреналина, вызванное K^+ (40 ммоль/л) (а) и старых (б) крыс: 1 — контроль, 2 — 10^{-3} моль/л НААК. Стандартное отклонение не более 10 %. Обозначена достоверность различий, по...

предположить, что НААК участвует в пресинаптической регуляции высвобождения НААК, нарушая механизм высвобождения.

Таким образом, в старческом возрасте высвобождение НААК из синапсов и захват НААК синапсами можно рассматривать как механизм регуляции высвобождения НААК в старении.

A. R. Armenyan, L. N. Arakelyan, C.

THE UPTAKE AND K^+ -EVOKED RELEASE OF ^3H -NOREADRENALINE IN THE RAT MESODIENEPHALIC SYNAPSES: THE ROLE OF N-ACETYL-L-ASP.

The uptake and K^+ -evoked (40 mM) release of ^3H -noreadrenaline from mesodiencephalic synaptosomes of adult and old rats. The effect of N-acetyl-L-aspartate (NAA) on these processes. The uptake of ^3H -NE by old rats is reduced. The effect of 10^{-3} M NAA on the uptake of ^3H -NE by old rats is significantly reduced. In these concentration synaptosomes of adult rats, but it is

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic

Физиол. журн., 1990, т. 36, № 5

В пресинаптической регуляции высвобождения НА наиболее важным является механизм отрицательной обратной связи, опосредуемой α -адренорецепторами. В пресинаптической области адренергических нейронов наряду с α -адренорецепторами имеются также рецепторы, участвующие в механизме обратной отрицательной связи, чувствительные к дофамину, мускарину, ГАМК, простагландинам, а также β -адренорецепторы, которые регулируют высвобождение НА положительной обратной связью. На основании полученных нами результатов можно

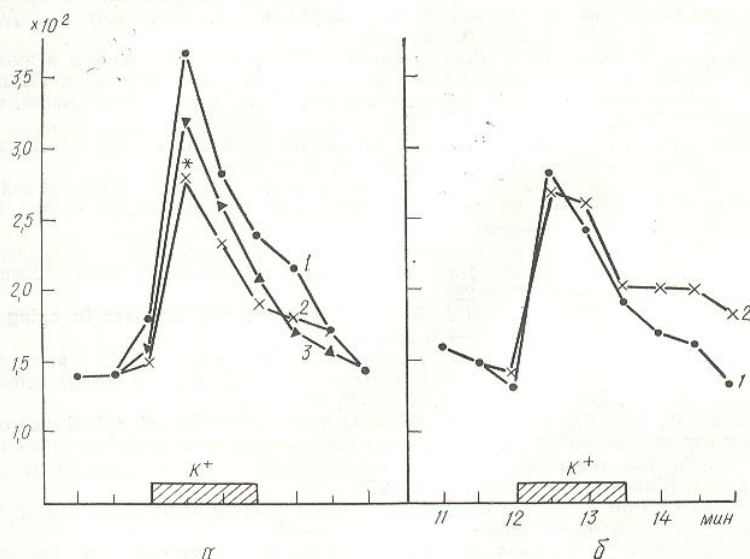


Рис. 3. Влияние N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты (NAAK) на высвобождение ^3H -норадреналина, вызванное K^+ (40 ммоль/л), из мезодиэнцефальных синапсосом взрослых (а) и старых (б) крыс:

1 — контроль, 2 — 10^{-3} моль/л NAAK, 3 — 10^{-4} моль/л NAAK. Средние данные 3–7 опытов. Стандартное отклонение не более 10%. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Звездочкой обозначена достоверность различий, по сравнению с контролем, составляющая $<0,001$.

предположить, что NAAK принимает участие в механизме пресинаптической регуляции высвобождения НА и что при старении этот механизм нарушается.

Таким образом, в старческом возрасте снижены захват и вызванное высвобождение НА в синапсосомах головного мозга. Ослабление захвата НА синапсосомами в ответ на подавление его высвобождения можно рассматривать как проявление компенсаторных способностей мозга, направленных на регулирование синаптических процессов при старении.

A. R. Armenyan, L. N. Arakelyan, G. V. Aprikyan

THE UPTAKE AND K^+ -EVOKED RELEASE OF ^3H -NOREPINEPHRINE IN THE RAT MESODIENCEPHALIC SYNAPTOSOMES IN AGING. THE ROLE OF N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID

The uptake and K^+ -evoked (40 mM) release of ^3H -norepinephrine (^3H -NE) in mesodiencephalic synaptosomes of adult and senescent rats and the effect of N-acetyl-L-aspartic acid (NAA) on these processes have been studied. It has been shown that the uptake of ^3H -NE by old rats is reduced considerably. The K^+ -evoked release of ^3H -NE from rats synaptosomes is significantly decreased in aged rats. In the presence of 10^{-4} – $3 \cdot 10^{-3}$ M NAA the uptake of ^3H -NE by adult and senescent rats synaptosomes remains unchanged. In these concentrations NAA inhibits the K^+ -evoked release of ^3H -NE from synaptosomes of adult rats, but it exerts no effect on this process in senescent rats.

Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

1. Априкян Г. В., Гекчян К. Г., Вартанян А. А. Ca^{2+} -зависимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из нервных окончаний головного мозга белых крыс при старении // *Нейрохимия*.— 1987.— 6, № 3.— С. 325—330.
2. Априкян Г. В., Князян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С. Роль *N*-ацетил-*L*-аспарагиновой кислоты в механизме действия нейромедиаторных аминокислот // *Нейрохимия*.— 1987.— 6, № 1.— С. 71—76.
3. Армениян А. Р., Чифлякян М. Д., Бунятыан Г. Х. Влияние гамма-аминомасляной кислоты и биккуллина на вызванное электрической стимуляцией высвобождение ^3H -норадреналина из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс // *Вопр. биохимии мозга*.— 1980.— 14.— С. 135—142.
4. Гекчян К. Г., Априкян Г. В. Роль *N*-ацетил-*L*-аспарагиновой кислоты в высвобождении нейромедиаторных аминокислот из синапсом головного мозга белых крыс при старении // *Мол. и функц. механизмы онтогенеза: Тез. докл. Всесоюз. симп.*— Харьков, 1987.— С. 49—50.
5. Burchinsky S. G. Neurotransmitter receptors in the CNS and aging. Pharmacological aspect // *Exp. Gerontol.*— 1984.— 19, N 4.— P. 227—240.
6. Burgal M., Jorda A., Grisolia J. Effects of *N*-acetyl aspartate, aspartate and glutamate on AMP and GMP levels in developing rat cerebral cortex // *J. Neurochem.*— 1982.— 38, N 5.— P. 1498—1500.
7. Burgal M., Lizondo J., Jorda A., Grisolia S. Inhibition of *N*-acetyl-*L*-aspartate of aspartate binding to a proteolipid fraction from rat cerebral cortex // *Neurochem. Res.*— 1984.— 9, N 2.— P. 219—224.
8. Carjagna N., Trunzo F., Moretti J. Brain CA content and turnover in aging rats // *Exp. Gerontol.*— 1985.— 20, N 5.— P. 265—270.
9. Curatolo A., Marchetti M., Brancati A., Salteo A. Azione degli acidi *N*-acetyl-aspartico e *N*-acetyl-glutamico sull' attivita elettrica spontanea della corteccia cerebrale di gatto // *Arch. Sci. Biol.*— 1967.— 51, N 1.— P. 98—103.
10. Curtis D. R., Watkins J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids // *J. Neurochem.*— 1960.— 6, N 1.— P. 117—141.
11. Finch C. E. The regulation of physiological changes during mammalian aging // *Quart. Rev. Biol.*— 1976.— 51.— P. 261—276.
12. Gibson G., Perrino P., Dienel G. A. In vivo brain calcium homeostasis during aging // *Mech. Ageing Develop.*— 1986.— 37, N 1.— P. 1—12.
13. Glick R., Bondareff W. Loss of synapses in the cerebellar cortex of the senescent rat // *J. Gerontol.*— 1979.— 34, N 6.— P. 818—822.
14. Hajos F. An improved method for the preparations of synaptosomal fractions in high purity // *Brain Res.*— 1975.— 93, N 3.— P. 485—489.
15. Long-Wu Zhou, Weiss B., Freilich J. S., Greenberg Z. H. Impaired recovery of α -phaz-adrenergic receptors in brain tissue of aged rats // *J. Gerontol.*— 1980.— 39, N 5.— P. 538—546.
16. McIntosh H. H., Westfall T. C. Influence of aging on CA levels, accumulation and release in F-344 rats // *Neurobiol. aging.*— 1987.— 8, N 3.— P. 233—240.
17. Reichelt K. L., Fonnum F. Subcellular localization of *N*-acetyl-aspartyl-glutamate, *N*-acetyl-glutamate and glutathione in brain // *J. Neurochem.*— 1969.— 16, N 9.— P. 1409—1416.
18. Scopes R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm // *Anal. Biochem.*— 1974.— 59, N 1.— P. 277—284.
19. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H. *N*-acetyl-*L*-aspartic acid in brain // *J. Biol. Chem.*— 1956.— 219, N 1.— P. 257—265.
20. Watanabe H. Differential decrease in the rate of dopamine synthesis in several dopaminergic neurons of aged rat brain // *Exp. Gerontol.*— 1987.— 22, N 1.— P. 17—26.
21. Wheeler D. D. Aging of membrane transport mechanisms in the CNS-high affinity glutamic acid transport in rat cortical synaptosomes // *Ibid.*— 1980.— 15, N 4.— P. 269—284.

Ин-1 биохимии АН АрмССР, Ереван

Материал поступил
в редакцию 30.02.90

Перспективы исследования активности генов при с

В кратком обзоре представлены гены в старении мозга, логических заболеваниях — гласно широко дискутируемые клеточные предрасмер, старение клонов культуры описывается как модель клетки, в отличие от пролонгации, следует отметить валентно постмитотический нейроны миокарда детей созревания лишь незначительных питательных образует деградации [14], нельзя утверждать обычно большинство систем не имеют признаков продолжительности жизни низирующий гормон-рилиз длительное повышение скорости наступления менопаузы прогрессивно увеличивающиеся раздражителям у пожилых лиз РНК мозга крыс-самки менений содержания мРНК лирибосом) или последовательности разных видов мРНК старении происходят существенно, в гиппокампе, коре гипоталамуса [10, 27], которые включаются в регуляцию синтеза белков, снижение количеств белков, встречающиеся исследования встречаются у всех индивидов.

Мы пытаемся определить, какие гены приводят к нарушению старения. В настоящее время в механизмах старения много неясного развивается синдром поражения нейронов в настоящей работе не разрешают одновременно.

Синдром деафферентации мозга умерших зрелых животных, имеющих возрастную неспособность к сокращению, ядрышек [19] например, в черной субстанции холинергических ядер гипоталамуса, входящих в состав нейрона субстанции, неожиданным, так как оставшихся нейронов у старых животных сниженный синтез дофамина повышенной продукции тирозина.

Мы создали модель старения с помощью трансгенных животных субстанции нигры.

© К. Е. Финч, 1990.