

ДИНАМІКА ВМІСТУ ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО КИСЛОГО БІЛКА І ЛІЗОСОМНИХ ПРОТЕАЗ У ФРОНТАЛЬНІЙ КОРІ ЩУРІВ ПРИ ФОРМУВАННІ УМОВНО- РЕФЛЕКТОРНОЇ ПАМ'ЯТІ

Дніпропетровська державна медична академія*
(зав. ЦНДЛ – д. мед. н., проф. О.Л. Дроздов)
Дніпропетровський національний університет**

Ключові слова: нейроспецифічний білок, цистеїновий катепсин В, неокортекс, навчання, пам'ять
Key words: neurospecific protein, cysteine cathepsin B, neocortex, training, memory

Резюме. Исследована динаміка концентрації гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) і рівней свободної і неседиментированной форм активності катепсина В (КФ 3.4.22.1) фронтальної зони неокортекса головного мозгу крыс при формуванні умовної реакції активного ухилення (УРАИ). Иммуноферментное определение содержания ГФКБи активностей лизосомного цистеинового катепсина В проводили через 3, 7, 14 и 21 сутки после начала обучения животных. Установлено, что повышение уровней активности исследуемой протеазы на фоне изменения концентрации нейроспецифического белка опытных крыс при воспроизведении УРАИ может быть одним из механизмов, обеспечивающих перестройку нейронных паттернов в процессах обучения, а также объективной оценкой состояния данной интегративной функции мозга.

Summary. Both glial fibrillar acid protein (GFAP) content dynamics and free and/nonsedimentation cathepsin B (EC 3.4.22.1) activity levels in frontal neocortex of rat brain were researched during the formation of conditioned active avoidance reaction (CAAR). Immunoenzymatic determination of GFAP content and lysosomal cysteine cathepsin B activity was carried out after 3-d, 7-th, 14-th, and 21-st day of training of animals. It was established that the increase of researched protease activity levels with neurospecific protein content changes in experimental rats during CAAR reproduction may be one of the mechanisms providing re-building of neuronal patterns during training processes, as well as objective estimation of state of this integrative brain function.

Суттєву роль у феномені пластичності нервової системи відіграють астрогліальні клітини, які беруть участь у регуляції метаболізму і активності нейронів. Гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) проміжних філаментів цитоскелету мозку (glial fibrillary acidic protein) [3] знаходиться як у розчинній, так і у філаментній формах; пул останнього складається з ГФКБ, зв'язаного з проміжними філаментами. Розчинна форма притаманна деградованому ГФКБ. Гліальний фібрилярний кислий білок – астрочитарно-специфічний білок залучається до процесів малігнізації синаптогенезу, клітинної адгезії, росту нейритів тощо. Для астроцитів визначені рецептори, які контролюють роботу іонних каналів, систему вторинних менеджерів і впливають на астроцит-нейронні взаємодії [2]. ГФКБ залучається до процесів формування відростків астрочитарних одиниць у відповідь на стимуляцію нейронів, а також до пластичних перебудов синаптичних зв'язків [3]. Дослідження останніх років присвячені визначенню ролі

біосинтезу нейроспецифічних білків у процесах навчання, формуванні і збереженні енграм пам'яті. Інтерес до цих білків підвищився у зв'язку з тим, що їх обмін значно змінюється при навчанні, виробленні нових поведінкових навичок. За даними Spinkova et al [9], спрямованість і рівень цитохімічних змін у відповідності до інформаційного навантаження можуть бути маркерами рівня навченості. При дослідженні нейрохімічних і молекулярних механізмів нейрологічної пам'яті важливе місце належить обміну білків, необхідною складовою якого є процеси протеолізу і модифікації синтезу [4]. Лізосомні цистеїнові протеази беруть участь у деградації білків, які потрапляють з аксоплазматичним потоком, і в подальшому амінокислоти використовуються для створення нових білків безпосередньо у синаптичній ділянці. Підвищений рівень протеолізу супроводжує нейрональну дегенерацію. Активацію лізосомного цистеїнового катепсину В (КФ 3.4.22.1) встановлено при хворобі Альцгеймера [8].

Для поглибленого розуміння ролі цистеїнових катепсинів і обмеженого протеолізу в процесах формування, зберігання і відтворення пам'ятного сліду нами було поставлено за мету дослідити зміни концентрації філаментної форми ГФКБ і динаміку активності катепсину В у фронтальній зоні неокортексу головного мозку щурів при виробленні умовної реакції активного уникнення (УРАУ).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на 79 щурах лінії Вістар масою 180-230г. Для оцінки динаміки рівнів активності катепсину В і вмісту нейроспецифічного білка ГФКБ у процесі формування енграм пам'яті як модель мнестичних реакцій використано умовну реакцію активного уникнення (УРАУ). Вибір даної моделі зумовлений можливістю тестування стану процесу формування енграм пам'яті протягом кожної доби навчання. Умовну активно-оборонну навичку формували в Y-подібному лабіринті з електрифікованою підлогою відсіків. Умовним стимулом слугував світловий подразник, а безумовним підкріпленням - ноцицептивна електростимуляція. Навчання тварин проводили по шість сеансів на тиждень із 10 сполученнями умовного сигналу з безумовним підкріпленням до досягнення критерію навчання 95% переходів в освітлений відсік, які відбувалися до подачі ноцицептивного подразника. Через 2 год. після закінчення сеансів навчання тварин декапітували. Всі операції з тканинами головного мозку виконували за $t=0-4^{\circ}\text{C}$.

Показники формування енграм умовно-рефлекторної пам'яті, вмісту ГФКБ та активності катепсину В у фронтальній зоні неокортексу головного мозку контрольних і дослідних щурів аналізували через 3, 7, 14 і 21 добу після початку вироблення УРАУ. Вміст філаментної форми ГФКБ визначали у цитоскелетній фракції фронтальної зони неокортексу методом твердофазного імуоферментного аналізу. При цьому використовували варіант інгібування антигеном [1] і концентрацію ГФКБ виражали в мкг/г тканини. Вільну активність катепсину В виявляли в 10%-му розчині гомогенатів у 0,025 М трис-буфері з рН 7,4, який містить 0,15 М NaCl та 1мМ EDTO, неседиментовану фракцію отримували із застосуванням центрифуги VAC-601 (105000 g x 50 хв.).

Активність катепсину В досліджували за розщепленням *p*-нітроаніліду N, α -бензоїл-D, L-аргініну (БАПА) ("Fluka", Швейцарія) [5] і виражали – в мкмоль *p*-нітроаніліну за 1 хв. на 1 мг білка. Кількісну оцінку загального білка в

пробах проводили за методом Бредфорда [6]. Результати статистично обробляли із застосуванням *t*-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлені закономірні зміни концентрації філаментної форми ГФКБ та вільної і неседиментованої форм активності лізосомного цистеїнового катепсину В у фронтальній зоні неокортексу щурів у процесі вироблення умовно-рефлекторної пам'яті.

Динаміка вмісту нейроспецифічного білка ГФКБ у цитоскелетній фракції неокортексу при формуванні УРАУ надана на рисунку. Показано, що на 7 та 14 добу спостережень концентрація ГФКБ у мозку піддослідних щурів вірогідно зменшилась на 64% та 62% відповідно порівняно з контролем. На 21 добу вироблення УРАУ спостерігали закріплення навички УРАУ, яке виявлялося у поступовому скороченні латентного періоду, і саме на 21 добу після початку навчання відзначали підвищення експресії ГФКБ в 2, 3 рази порівняно з контролем.

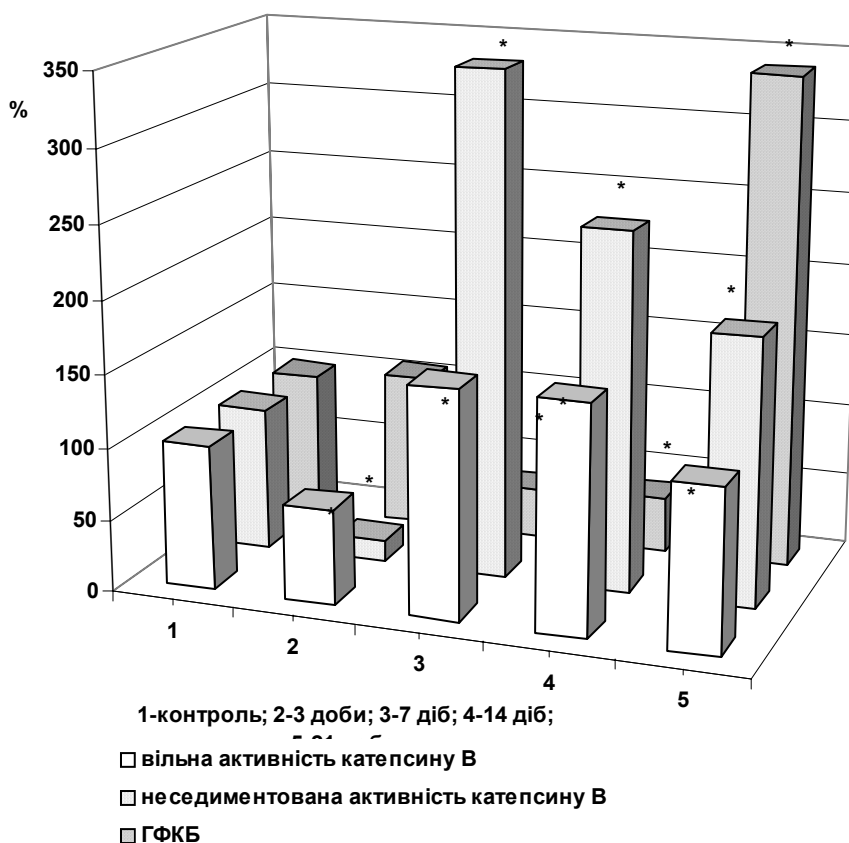
Особливістю динаміки катепсину В було вірогідне зниження як вільної, так і неседиментованої активності на 34% і 86% ($p<0,05$) на третю добу з початку навчання (рис.) і істотне підвищення на 7 добу формування УРАУ на 57% вільної активності та в 3,5 рази неседиментованої порівняно з контролем. Визначення вільної і неседиментованої форм активності катепсину В є інформативним у сенсі встановлення змін компартменталізації катепсинів у клітинах мозку при навчанні, а визначення неседиментованої активності є найбільш поширеним і визнаним методом оцінки стабільності мембран лізосом [7]. На наступному етапі (21 доба) вироблення у щурів умовної активно-оборонної навички вільна і неседиментована активності катепсину В знижуються порівняно з попереднім терміном, але залишаються вище за норму, особливо неседиментована форма активності. Враховуючи дані про те, що рівень експресії нейроспецифічних білків корелює зі стадіями формування енграм пам'яті [8], ми можемо припустити, що встановлені нами зміни концентрації ГФКБ можуть відбивати етапи формування умовно-рефлекторної пам'яті. Ці дані узгоджуються з уявленнями про важливу роль ГФКБ у забезпеченні синаптичної пластичності. Астрогліальні клітини тісно асоційовані із синаптичними структурами нейронів і мають рецептори, які реагують на нейротрансмітерну стимуляцію [9].

Отримані результати підтверджують істотну реактивність лізосом клітин нервової тканини, в

першу чергу клітин неокортексу головного мозку, щодо вироблення пам'ятного сліду і високу чутливість протеолізу кори головного мозку експериментальних щурів при виробленні УРАУ.

Показано, що підвищення активності катепсину В може бути пов'язано зі збільшенням мРНК катепсину В, тому що катепсин В кодується одним особистим геном і не дає перехресної гібридизації з мРНК катепсину Н,

катепсину L і кальпаїнів [10]. Існує різниця у процесингу катепсину В у секреторних пухирцях та лізосомах, яка може привести до утворення активних високомолекулярних форм ферменту зі специфічними характеристиками. Можливо, цією особливістю і пояснюються різні рівні вільної і неседиментованої активності катепсину В у фронтальній зоні неокортексу головного мозку щурів при формуванні УРАУ.



Динаміка вільної, неседиментованої активності катепсину та вмісту ГФКБ у фронтальній зоні неокортексу щурів у процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті: вільна активність катепсину В, неседиментована активність катепсину В, ГФКБ

Примітка: * $p < 0,05$ – вірогідність зміни по відношенню до контролю

ВИСНОВКИ

1. Таким чином, експериментально встановлено, що в процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті у щурів у фронтальній зоні неокортексу зміни концентрації нейроспецифічного ГФКБ і активності катепсину В відбивають складний характер взаємовідносин білок-синтетичних і протеолітичних процесів.

2. Визначені підвищення вільної і неседи-

ментованої активності катепсину В свідчать про вірогідний мембранотропний вплив вироблення УРАУ на лізосомально-вакуолярний апарат неокортексу головного мозку піддослідних тварин.

3. Встановлені зміни концентрації філаментної форми ГФКБ і рівнів активності катепсину В можуть бути об'єктивною оцінкою даної інтегративної функції мозку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антитела. Методы / Под ред. Кетти. – Д., М.: Мир, 1991.-384 с.
2. Дроздов А.Л., Черная В.И. Нейроспецифические белки ГФКБ и NSAM гиппокампа при формировании энграмм условно-рефлекторной памяти // Нейрохимия. – 2005.-Т. 22, №4.- С. 285-289.
3. Дука Т.Т., Лещинська І.О., Чорна В.І. Характеристика гліального фібрилярного кислого білка – компоненти астрогліальних проміжних філаментів центральної нервової системи // Біополімери і клітина. –2002.-Т. 18, №3.- С. 179-185.
4. Artal – Sanz P., Tavernakis N. Proteolytic mechanisms in neurotic cell death and neurodegeneration // FEBS Left.- 2005.- Vol. 579.-P. 3287-3296
5. Barrett A. J., Kirske H., Cathepsin B. // Meth. Enzymol.- 1981.- Vol. 80.- P.535-561.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utiliring the principle of protein-dye binding // Aval. Biochen.- 1976.-Vol. 72.-P. 248-250.
7. Guicciardi M., Leist M., Gores G. Lysosomes in cell death // Oncogene.- 2004.- Vol. 23.- P. 2881-2890.
8. Mohamed M. M., Sloane B. Cystein cathepsins: Multi functional enzyme in cancer // Nature.-2006. – N 6.-P. 764-775.
9. Shpinkova V., Gershtein L., Nikolskaya K. Individual recularites of rats learning and its cytochemical correlates // Eur. J. Neurosci.-1998. – Vol. 98, N10. – P.156-162.
10. Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cystein proteases: structural features and their role in apoptosis // IUBMB life.-2005.- Vol. 57.-P. 347-353.

