



О.Л. Дроздов, В.І. Чорна, Аль Насир Ейяд, Ал Нукарі Абдулкарім

## ДИНАМІКА ВМІСТУ ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО КИСЛОГО БІЛКА Й ЛІЗОСОМНИХ ПРОТЕАЗ У ФРОНТАЛЬНІЙ КОРИ ЩУРІВ ПРИ ФОРМУВАННІ УМОВНО-РЕФЛЕКТОРНОЇ ПАМ'ЯТІ

Дніпропетровська державна медична академія

**Ключові слова:** нейроспецифічний білок, цистеїновий катепсин В, неокортекс, навчання, пам'ять.

**Ключевые слова:** нейроспецифический белок, цистеиновый катепсин В, неокортекс, обучение, память.

**Key words:** neurospecific protein, cysteine cathepsin B, neocortex, training, memory.

Досліджено динаміку концентрації гліального фібрилярного кислого білка і рівнів вільної й неседиментованої форм активності катепсину В (КФ 3.4.22.1) фронтальної зони неокортексу головного мозку пацюків при формуванні умовної реакції активного уникнення. Імуноферментне визначення вмісту гліального фібрилярного кислого білка активностей лізосомного цистеїнового катепсину В проводили через 3, 7, 14 і 21 добу після початку навчання тварин. Установлено, що підвищення рівнів активності досліджуваної протеази на фоні зміни концентрації нейроспецифічного білка пацюків при відтворенні умовної реакції активного уникнення можуть бути одним із механізмів, що забезпечують перебудову нейронних паттернів у процесах навчання, а також об'єктивною оцінкою стану цієї інтегративної функції мозку.

Исследована динамика концентрации глиального фибриллярного кислого белка и уровней свободной и неседиментированной форм активности катепсина В (КФ 3.4.22.1) фронтальной зоны неокортекса головного мозга крыс при формировании условной реакции активного избегания. Иммуноферментное определение содержания глиального фибриллярного кислого белка и 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 крыс при воспроизведении условной реакции активного избегания могут быть одним из механизмов, обеспечивающих перестройку нейронных паттернов в процессах обучения, а также объективной оценкой состояния данной интегративной функции мозга.

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, 7, 14, and 21 days of training animals. It was established that the increase of researched protease activity levels with neurospecific protein content changes in researched rats during CAAR reproduction could be both one of the mechanisms providing the re-building of neuronal patterns during training processes, and objective state estimation of this integrative brain function.

Суттєву роль у феномені пластичності нервової системи відіграють астрогліальні клітини, що беруть участь у регуляції метаболізму й активності нейронів. Гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) проміжних філаментів цитоскелету мозку (glial fibrillary acidic protein) [3] перебуває 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 – астроцитарно-специфічний білок, залучається до процесів малігнізації синаптогенезу, клітинної адгезії, росту нейритів тощо. Для астроцитів визначені рецептори, що контролюють роботу іонних каналів, систему вторинних менеджерів і впливають на астроцит-нейронні взаємодії [2]. ГФКБ залучається до процесів формування відростків астроцитарних 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, формування та збереження енграм пам'яті. Інтерес до цих білків підвищився, оскільки їх обмін значно змінюється при навчанні, формуванні нових поведінкових навичок. За даними Spinkova et al [10], спрямованість і рівень цитохімічних змін у відповідності з інформаційним навантаженням 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 та модифікації синтезу [4]. Лізосомні цистеїнові протеази беруть участь у деградації білків, що 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].

### МЕТА РОБОТИ

Дослідження динаміки активності катепсину В у фронтальній зоні неокортексу головного мозку щурів при виробленні умовної реакції активного уникнення для поглибленого розуміння ролі цистеїнових катепсинів і обмеженого протеолізу в процесах формування, зберігання й відтворення пам'ятного сліду.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на 79 щурах лінії Вістар масою 180–230 г. 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 цієї моделі зумовлений можливістю тестування стану



процесу формування енграм пам'яті протягом кожної доби навчання. Умовну активно-оборонну навичку формували у Y-подібному лабіринті з електрифікованою підлогою відсіків. Умовним стимулом був світловий подразник, а безумовним підкріпленням – ноцицептивна електростимуляція. Навчання тварин проводили по 6 сеансів на тиждень з 10 сполученнями умовного сигналу з безумовним підкріпленням до досягнення критерію навчання 95% переходів в освітлений відсік, що відбувались 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 імуноферментного аналізу. При цьому використовували варіант інгібування антигеном [1] і концентрацію ГФКБ виражали в мкг/г тканини. Вільну активність катепсину В виявляли в 10% розчині гомогенатів у 0,025 М трис-буфері з рН 7,4, що містить 0,15 М NaCl та 1 мМ EDTO, неседиментовану фракцію отримували із застосуванням центрифуги VAC-601 (105000  $g \times 50$  хв).

Активність катепсину В досліджували за розщепленням р-нітроаніліду N, 6-бензоіл-D, L-аргініну (БАПА) («Fluka», Швейцарія) [5] і виражали в мкмоль р-нітроаніліну за 1 хв на 1 мг білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорда [6]. Статистична обробка результатів здійснена із застосуванням t-критерію Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

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

Динаміку вмісту нейроспецифічного білка ГФКБ у цитоскелетній фракції неокортексу при формуванні УРАУ наведено на рис. 1. Показано, що на 7 та 14 добу спостережень концентрація ГФКБ у мозку дослідних щурів вірогідно зменшилась на 64% і 62% відповідно, порівняно з контролем. На 21 добу вироблення УРАУ спостерігали закріплення її навички, що проявилось у поступовому скороченні латентного періоду, і саме на 21 добу після початку навчання відзначали підвищення експресії ГФКБ у 2,3 рази, порівняно з контролем.

Особливістю динаміки катепсину В було вірогідне зниження вільної і неседиментованої активності на 34% і 86% ( $p<0,05$ ) на 3 добу від початку навчання (рис. 1 А, Б) та 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 для встановлення змін компартменталізації катепсинів у клітинах

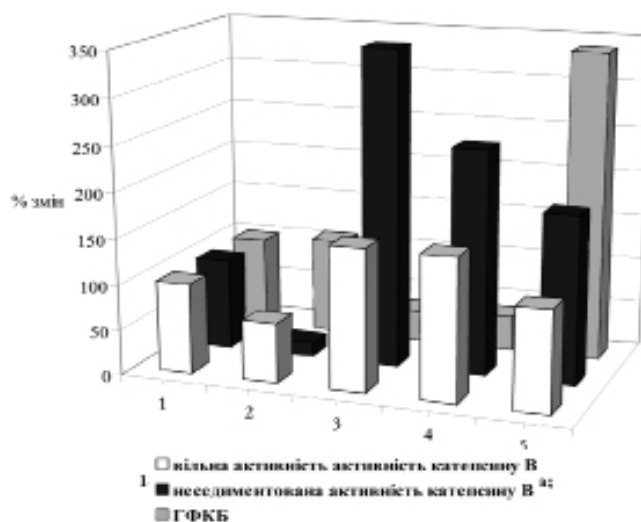


Рис. 1. Динаміка вільної, неседиментованої активності катепсину та вмісту ГФКБ у фронтальній зоні неокортексу щурів у процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті: вільна активність катепсину В (мкмоль р-НА за 1 хв на 1 мг білка); неседиментована активність катепсину В, 1-ГФКБ (мкг/г тканини),  $M \pm m$ ,  $n=8$ .

Примітка: \* $p<0,05$  – вірогідність зміни відносно контролю.

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 й неседиментована активності катепсину В знижуються, порівняно з попереднім терміном, але залишаються вищими за норму, особливо неседиментована форма активності. Враховуючі дані про те, що рівень експресії нейроспецифічних білків корелює зі стадіями формування енграм пам'яті [8], можна припустити, що встановлені зміни концентрації ГФКБ можуть відбивати етапи формування умовно-рефлекторної пам'яті. Ці дані відповідають відомостям про важливу роль ГФКБ у забезпеченні синаптичної пластичності. Астрогліальні клітини тісно асоційовані з синаптичними структурами нейронів і мають рецептори, що реагують на нейротрансмітерну стимуляцію [10].

Отримані результати підтверджують істотну реактивність лізосом клітин нервової тканини, в першу чергу, клітин неокортексу головного мозку щодо вироблення пам'ятного сліду й 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, оскільки катепсин В кодується одним особистим геном і не дає перехресної гібридизації з мРНК катепсину Н, катепсину L і кальпаїнів [9]. Існує різниця у процесінгу катепсину В у секреторних пухирцях і лізосомах, що може призвести 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.

**ВИСНОВКИ**

1. Експериментально встановлено, що в процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті у щурів у фронтальній зоні неокортекса зміни концентрації нейроспецифічного ГФКБ й активності катепсину В відбивають складний характер взаємодії білок-синтетичних і протеолітичних процесів.

2. Визначене підвищення вільної і неседиментованої активності катепсину В свідчить про вірогідний мембранотропний вплив вироблення УРАУ на лізосомально-вакуолярний апарат неокортексу головного мозку дослідних тварин.

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

**ЛІТЕРАТУРА**

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

**Відомості про авторів:**

Дроздов О.Л., д. мед. н., професор, зав. ЦНДЛ ДДМА.  
Чорна В.І., д. біол. н., гол. наук. співроб. ЦНДЛ ДДМА.  
Аль Насир Ейяд, аспірант ЦНДЛ ДДМА.  
Ал Нукарі Абдулкарім, аспірант ЦНДЛ ДДМА.

**Адреса для листування:**

Дроздов Олексій Леонідович, м. Дніпропетровськ, Жовтнева площа, 4, ЦНДЛ ДДМА.  
Тел.: (056) 713 53 51.  
E-mail: cndl\_ddma@mail.ru