

Дослідження нейроспецифічних білків та лізосомних протеаз фронтальної зони неокортексу при формуванні умовної реакції активного уникнення у щурів

О. Л. Дроздов, В. І. Чорна¹, О. С. Кошелєв, О. К. Вяткін

Дніпропетровська державна медична академія
Вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, Україна, 49044

¹Дніпропетровський національний університет
Просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, Україна, 49010

v-ch-49a@mail.ru

Досліджено зміни концентрації нейрональної молекули клітинної адгезії (NCAM) і динаміку активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L і Н у фронтальній зоні неокортексу головного мозку щурів при виробленні умовної реакції активного уникнення. Кількісну оцінку вмісту NCAM у мембранній фракції неокортексу здійснено методом твердофазного імуноферментного аналізу. Дослідження проводили через 3, 7, 14 і 21 добу після початку навчання. Визначено підвищення вмісту NCAM і рівнів активності цистеїнових катепсинів (особливо амінопептидази – катепсину Н) у процесі формування енграм пам'яті.

Ключові слова: NCAM, цистеїнові катепсини, навчання, пам'ять.

Вступ. Однією з найактуальніших проблем медико-біологічних досліджень є проблема нейрохімічних і молекулярних механізмів нейрологічної пам'яті [1]. Нейрологічна пам'ять формується, зберігається та відтворюється на різних рівнях, починаючи з молекулярного, надмолекулярного, субклітинного і закінчуючи міжклітинним рівнем, на якому нейрони починають взаємодіяти між собою за посередництвом синапсів, нейромедіаторів, гормонів і нейроспецифічних білків [2, 3].

Одним із видів клітинних контактів є адгезивна взаємодія, що здійснюється за участі мембранних

глікопротеїнів – молекул клітинної адгезії. Молекула адгезії нервових клітин (NCAM) – нейроспецифічний білок, що забезпечує клітинну адгезію при взаємодіях типу нейрон–нейрон або нейрон–матрикс [4]. NCAM причетний до синаптичних механізмів, на яких базуються процеси навчання та пам'яті [5]. Значну концентрацію цього білка визначено в пре- і постсинаптичних мембранах нейронів, що свідчить про його участь в синаптичних модифікаціях, спричинених нейрональною та імпульсною активністю. Відомо, що в основі навчання лежать процеси, пов'язані із зростанням кількості синапсів та залученням до асоціативного процесу різних синаптичних і мембранних механіз-

мів пластичності [3]. Через дію екстраординарних подразників поряд з деструктивними процесами в організмі розвиваються і проліферативні, які залежать від єдиного, загального для них фактора – стану лізосомного апарату клітини. В обох процесах ключові позиції займають лізосоми, причому вони не лише відіграють роль ініціюючого об'єкта, а й забезпечують контроль за розвитком деструктивних порушень в організмі [1, 4]. Зв'язок активації лізосомного апарату з виникненням патологічних змін в організмі на сьогодні є загальноновизнаним.

Значно складніше визначити роль лізосом в адаптивно-відновлювальних процесах, що відбуваються внаслідок дії надзвичайних подразників. При дослідженні нейрохімічних і молекулярних механізмів нейрологічної пам'яті виходять з того, що в процесі навчання, запам'ятовування, адаптації до будь-якого впливу реєструють зміни (молекулярні та/чи цитологічні) у нейронах ЦНС, здатні зберігатися протягом певного проміжку часу [1].

Це актуальна та складна проблема, вирішення якої має істотне значення для керування адаптивними реакціями організму, включаючи пам'ять [5].

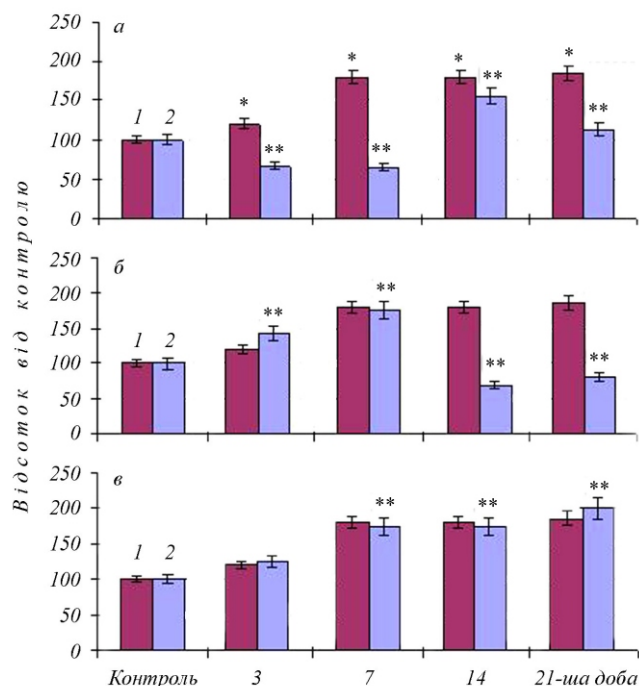
При формуванні довгострокової пам'яті важливе місце належить обміну білків, необхідною складовою якого є процеси протеолізу і модифікації синтезу [6]. Відомо, що лізосомні ферменти беруть участь у деградації білків, які потрапляють разом з аксоплазматичним током, з наступним використанням амінокислот для утворення нових білків безпосередньо у синаптичній ділянці [7]. Близько 65–80 % розчинних лізосомних пептидогідролаз належать до цистеїнових [8]. Серед них найактивнішими є катепсин В (КФ 3.4.22.1), катепсин L (КФ 3.4.22.15), катепсин Н (КФ 3.4.22.19). Їхні біологічні функції пов'язані з внутрішньо- і зовнішньоклітинним протеолізом та процесингом білків і пептидів. Підвищення рівня протеолізу супроводжує нейрональну дегенерацію або дисфункцію ділянок мозку у літніх людей, зокрема, встановлено активацію цистеїнового катепсину В при хворобі Альцгеймера [9, 10]. Вивчення властивостей реакцій обмеженого протеолізу дозволяє зрозуміти роль цистеїнових катепсинів у функціонуванні складної адаптивної системи організму, яка включає процеси формування, зберігання і відтворення

пам'ятного сліду з урахуванням значення конкретних мозкових утворень, що відіграють у них вирішальну роль [11].

Для поглиблення розуміння нейрохімічних механізмів нейрологічної пам'яті нами визначено зміни активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L, Н та вмісту нейроспецифічного білка NCAM у фронтальній зоні кори великих півкуль головного мозку при формуванні умовно-рефлекторної пам'яті щурів.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на 79 щурах лінії Вістар масою 180–230 г. Для оцінки динаміки рівнів активності катепсинів В, L, Н і вмісту нейроспецифічного білка NCAM у процесі формування енграм пам'яті як модель мнестичних реакцій використано умовну реакцію активного уникнення (УРАУ) [3]. Вибір даної моделі обумовлений 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 $t = 0-4$ °С.

Показники формування енграм умовно-рефлекторної пам'яті, вмісту NCAM та активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L, Н у фронтальній зоні неокортексу головного мозку контрольних і дослідних щурів аналізували через 3, 7, 14 і 21 добу після початку вироблення УРАУ. Вміст NCAM визначали у мембранній фракції фронтальної зони неокортексу методом твердофазного імуноферментного аналізу. При цьому використовували варіант інгібування антигеном [12] і концентрацію NCAM виражали в мкг/г тканини. Вільну активність катепсинів В, L, Н виявляли в 10 %-му розчині гомогенатів у 0,025 М трис-буфері з рН 7,4, який містить 0,15 М NaCl та 1 мМ EDTO [6].



Динаміка вмісту NCAM та рівня вільної активності цистеїнових катепсинів В (а), L (б), Н (в) у фронтальній зоні неокортексу щурів у процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті: 1 – NCAM (мкг/г тканини), %; 2 (а) – катепсин В (мкмоль р-нітроаніліну за 1 хв на 1 мг білка⁻¹), %; 2 (б) – катепсин L (ум. од. за 1 хв на 1 мг білка), %; 2 (в) – катепсин Н (мкмоль 2-нафтиламину за 1 хв на 1 мг білка), %; $M \pm m$, $n = 8$; * p і ** $p < 0,05$ порівняно з контролем для NCAM і катепсинів відповідно

Активність катепсину В досліджували за розщепленням р-нітроаніліду N, -бензоїл-D,L-аргініну (БАПА) («Fluka», Швейцарія) [13], активність катепсину L – за гідролізом 1 %-го азоказеїну, денатурованого 3 М сечовиною [14], активність катепсину Н – за гідролізом 2-нафтиламиду L-лейцину (Leu-НА, «Koch-Light Laboratories», Велика Британія) [15].

Питому активність визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з попередньою інкубацією ферментів протягом 15 хв за присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 2 мМ Na₂-EDTO. Активність виражали при застосуванні субстратів: БАПА – в мкмоль р-нітроаніліну за 1 хв на 1 мг білка; Leu-НА – мкмоль 2-нафтиламину за 1 хв на 1 мг білка; азоказеїну – в умовних одиницях абсорбції при 366 нм за 1 хв на 1 мг білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорда [16].

Результати статистично обробляли, як у роботі [17].

Результати і обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено закономірні зміни концентрації мембранозв'язаної форми NCAM і вільної активності досліджуваних цистеїнових катепсинів В, L, Н у фронтальній зоні неокортексу щурів у процесі формування умовно-рефлекторної пам'яті.

Особливістю динаміки вмісту нейроспецифічного білка NCAM у мембранній фракції та вільної активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L, Н на фоні змін нейроспецифічного білка NCAM при формуванні УРАУ представлено на рисунку (а, б, в відповідно).

Особливістю динаміки активності катепсину В було вірогідне зниження її на 33 і 35 % ($p < 0,05$) на 3-тю і 7-му доби навчання (рисунк, а) і підвищення на 57 % порівняно з контролем на 14-ту добу. Тенденція до зростання рівня активності катепсину В відносно контролю спостерігається на 21-шу добу формування УРАУ. Варто зазначити, що підвищення вільної активності лізосомних цистеїнових катепсинів є ранньою чутливою ознакою зміни стабільності мембран лізосом [6]. Аналіз зміни концентрації NCAM свідчить про вірогідне зростання вмісту досліджуваного нейроспецифічного білка на 3-тю добу навчання. Саме на 3-тю добу після початку експерименту у тварин істотно зменшується кількість помилкових заходів у темний відсік лабіринту, паралельно збільшується частка реакцій активного позбавлення від дії ноцицептивного подразника. На наступному етапі (з 7-ї до 21-ї доби) вироблення у щурів умовної активно-оборонної навички у мембранних фракціях неокортексу концентрація NCAM вірогідно підвищується на 86 % з максимальним вмістом на 21-шу добу навчання, коли у тварин завершується формування стабільної умовно-рефлекторної пам'яті. Це може свідчити про зміцнення енграм пам'яті та можливе кодування інформації у довгострокову пам'ять. Навчання і пам'ять – це важливі прояви мінливості і пластичності нервової системи [13]. Встановлено кореляцію між підвищенням експресії і концентрації нейроспецифічних білків з етапами формування пам'яті.

Динаміку активності катепсину L і вмісту NCAM при формуванні умовно-рефлекторної пам'яті у щурів представлено на рисунку, б. Спостерігається зростання рівня вільної активності катепсину L на 43 і 77 % через 3 і 7 діб після початку вироблення УРАУ відповідно, а також зниження її на 14-ту та 21-шу доби спостережень відповідно на 30 та 28%.

Зміни рівня активності катепсину H та концентрації NCAM у фронтальній зоні неокортексу в процесі вироблення енграм умовно-рефлекторної пам'яті наведено на рисунку, в. Визначено, що при підвищенні експресії нейроспецифічного білка відбувається вірогідне збільшення рівня вільної активності лізосомної цистеїнової амінопептидази (катепсину H), починаючи з 3-ї доби вироблення УРАУ. Вільна активність катепсину H зростає на 75 % на 7-му та 14-ту доби навчання порівняно з контролем. Наші спостереження підтверджують дані про істотну реактивність лізосом клітин нервової тканини і, в першу чергу, клітин неокортексу головного мозку щодо вироблення пам'ятного сліду. Найвищий рівень активності катепсину H у фронтальній зоні неокортексу щурів встановлено на 21-шу добу формування умовно-рефлекторної пам'яті, аналогічний характер змін відмічено і для динаміки концентрації NCAM. Наведені дані свідчать про те, що лізосомні цистеїнові протеази – катепсини B, L і H – досить інтенсивно реагують на процес формування УРАУ, який розвивається в тканинах головного мозку та залучається до адаптивної перебудови обміну білків. В основі цього, очевидно, лежить зниження стабільності мембран лізосом, що призводить до зростання рівня вільної активності катепсинів у корі великих півкуль головного мозку дослідних щурів.

Висновки. Таким чином, визначені особливості динаміки вмісту нейроспецифічного білка (NCAM), який бере участь у регуляції процесів синаптичного ремоделювання, та, за даними Ямагата та ін. [18], здатний запускатися синаптичну пластичність і дозрівання структури синапсів, свідчать про те, що, починаючи з 3-ї доби вироблення УРАУ, вірогідне підвищення концентрації NCAM впливає на процеси пластичних перебудов синаптичних зв'язків у фронтальній зоні неокортексу го-

лового мозку щурів. Динаміка рівнів вільної активності лізосомних цистеїнових катепсинів на фоні змін вмісту NCAM у фронтальній зоні неокортексту щурів, де була сформована активно-оборонна навичка, свідчить про їхню відповідну фізіологічну і нейрохімічну роль у процесах навчання і формування УРАУ.

A. L. Drozdov, V. I. Chorna, O. S. Koshelev, O. K. Vyatkin

The research of neurospecific proteins and lysosomal peptidehydrolases in frontal neocortex during forming conditioned reaction of active avoiding of rats

Summary

Dynamics of the activity of neuronal cell adhesion molecule (NCAM) and lysosomal cysteine cathepsins B, L, H was researched in frontal neocortex of rat brain during forming a conditioned reaction of active avoiding. The quantitative estimation of NCAM content in the neocortex membrane fraction was carried on by ELISA in 3, 7, 14 and 21 days after starting animals' training. The dynamics correlation between the NCAM content increasing and cysteine cathepsins activity was obtained, especially for aminopeptidase cathepsin H during the process of memory engram forming in frontal neocortex of rat brain.

Keywords: NCAM, cysteine cathepsins, learning, memory.

A. Л. Дроздов, В. И. Черная, О. С. Кошелев, О. К. Вяткин

Исследование нейроспецифических белков и лизосомных протеаз фронтальной зоны неокортекса при формировании условной реакции активного избегания у крыс

Резюме

Исследованы изменения концентрации нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) и активности лизосомных цистеиновых катепсинов B, L и H во фронтальной зоне неокортекса головного мозга крыс при формировании навыка условной реакции активного избегания. Количественную оценку содержания NCAM в мембранной фракции неокортекса проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа через 3, 7, 14 и 21 сутки после начала обучения животных. Установлено повышение концентрации NCAM и уровней активности цистеиновых катепсинов (особенно аминопептидазы – катепсина H) в процессе формирования энграмм памяти.

Ключевые слова: NCAM, цистеиновые катепсины, обучение, память.

PERELIK LITERATURY

1. Ashmarin I. P. *Neurochimiya*.—M.: Izd-vo In-ta biomed. khimii RAMN, 1996.—470 s.
2. Nakanishi H. Microglial functions and proteases // *Mol. Neurobiol.*—2003.—27, N 2.—P. 163–176.
3. Kruglikov R. I. *Neurochimicheskie mekhanizmy obucheniya i pamyati*.—M.: Nauka, 1981.—211 s.
4. Sakisaka T., Takaj Y. Cell adhesion molecules in CNS // *J. Cell Sci.*—2005.—118, N 23.—P. 5407–5410.

5. Washbourne P., Dityatev A., Scheiffele P., Biederer T. Cell adhesion molecules in synapse formation // *J. Neurosci.*—2004.—**42**.—P. 9244–9249.
6. Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis // *IUBMB Life.*—2005.—**57**, N 4–5.—P. 347–353.
7. Derkachev V. V. Molekulyarnye i kletochnye mechanizmy pamyati.—M.: Medizina, 1977.—256 s.
8. Artal-Sanz P., Tavernakis N. Proteolytic mechanisms in neurotic cell death and neurodegeneration // *FEBS Lett.*—2005.—**579**.—P. 3287–3296.
9. Guicciardi M., Leist M., Gores G. Lysosomes in cell death // *Oncogene.*—2004.—**23**.—P. 2881–2890.
10. Nakamishi H. Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases // *Ageing Res. Rev.*—2003.—**2**.—P. 367–381.
11. Mohamed M. M., Sloane B. Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer // *Nature.*—2006.—**6**.—P. 764–775.
12. Ibsen S., Beresin V., Norgaard-Pedersen B., Bock E. Enzyme linked immunosorbent assay of D2-glycoprotein // *J. Neurochem.*—1983.—N 4.—P. 356–362.
13. Barrett A. J., Kirscke H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L // *Meth. Enzymol.*—1981.—**80**.—P. 535–561.
14. Berezin V. A., Chornaya V. I., Reva A. D., Smagina L. D. Purification and some properties of thiol-activated cathepsin from bovine cerebral hemispheres and cerebellum // *The Ukr. Biochem. J.*—1982.—**54**, N 3.—P. 249–253.
15. Chornaya V. I., Reva A. D. Cathepsin H activity in the human brain and head tumours // *The Ukr. Biochem. J.*—1989.—**61**, N 5.—P. 47–50.
16. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–250.
17. Lakin G. F. Biometriya.—M.: Vyssh. shk., 1990.—352 s.
18. Yamagata M., Weiner J., Sanes J. Synaptic adhesion molecules // *Mol. Neurobiol.*—2003.—N 23.—P. 167–176.

УДК 577:112.8:576.311.34:612.821.2-092.9

Надійшла до редакції 03.03.08