

Зміни концентрації гліального фібрилярного кислого білка у медіальному таламусі при формуванні умовної реакції активного уникнення

О. Л. Дроздов, В. І. Чорна¹

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

¹ Дніпропетровський національний університет
Пров. Науковий, 13, Дніпропетровськ, 49050, Україна

Досліджено зміни концентрації маркера проміжних філаментів цитоскелета астрогліальних клітин — гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) — у медіальному таламусі головного мозку щурів при виробленні умовної реакції активного уникнення (УРАУ). Кількісну оцінку вмісту ГФКБ у цитоскелетних фракціях тканини медіальної частини таламуса здійснювали методом твердофазного імуноферментного аналізу через 2 год та 1, 3, 7, 14, 21 і 30 діб після початку вироблення УРАУ. Вірогідне підвищення концентрації філаментної форми ГФКБ через 2 год та на першу добу після початку навчання з наступним зниженням даного показника до контрольного рівня на 30-ту добу свідчить про участь ГФКБ у процесах формування пам'ятного сліду у медіальному таламусі головного мозку щурів на ранніх етапах вироблення умовно-рефлекторної пам'яті.

Ключові слова: гліальний фібрилярний кислий білок, умовна реакція активного уникнення, медіальний таламус, навчання, пам'ять.

Вступ. Дослідження нейрохімічних і молекулярних механізмів нейрологічної пам'яті є однією з найактуальніших проблем медико-біологічних досліджень [1]. Відомо, що в основі довготривалих типів пам'яті лежить синтез нейроспецифічних білків головного мозку, які беруть участь у мнестичних процесах, наприклад, гіпокампу і мигдалевидний комплексу, а також ядер серединної частини таламуса [2, 3]. Вивчення мембранних нейроспецифічних білків тісно пов'язане з вирішенням таких питань, як структура і функції спеціалізованих контактів нервових клітин, механізми ембріональної клітинної міграції та ембріонального і пост-ембріонального синаптогенезу, взаємодія нейронів з нейрогліальними елементами, механізми синап-

тичної передачі, навчання, пам'ять [3—5]. Функціонування нормального мозку залежить від координованості процесів, у яких беруть участь нейрони і гліальні клітини [4, 6]. Нейрогліальні клітини є основним ланцюгом на шляху просування речовин від кровоносних судин до нейронів. Мембрани нейронів безпосередньо не контактують з капілярами, а відокремлені від них клітинами нейроглії, яка залучена до специфічних функцій нервової тканини [1, 4, 6].

Компонент проміжних філаментів цитоскелету астроглії — гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) — є маркером клітин астроцитарного походження в нормі та при патологічних станах [7—9]. Білковий цитоскелет, як відомо, регулює форму і об'єм клітини, а також стан поверхні мембрани, відіграє важливу роль у забезпеченні

таких фізіологічних процесів, як реалізація генетичної програми розвитку, динаміка структурної інтеграції метаболізму, просторового розташування молекулярних і субклітинних компонентів клітини [10].

Визначено роль ГФКБ у нейронно-гліальних взаємодіях, формуванні та засвоєнні рухливої навички [11]. Клінічними дослідженнями виявлено підвищення рівнів ГФКБ і ГФКБ мРНК у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, яка характеризується розладами мнестичних реакцій [12]. Дані роботи [13] також свідчать про залучення ГФКБ до встановлення зв'язків між генною експресією даного нейроспецифічного білка і процесами формування пам'ятного сліду. Показано, що ГФКБ бере участь у процесах цитоскелетної реорганізації, клітинної адгезії і підтриманні процесів мієлінізації [14], нейритного зростання, проведення мігруючих нейронів, синаптогенезу [15].

Наведені дані свідчать про те, що гліальний фібрилярний кислий білок відіграє істотну роль в організації нейронних сіток мозку і процесах, пов'язаних з їхніми пластичними перебудовами.

Метою наших досліджень було імуоферментне визначення змін концентрації ГФКБ у цитоскелетних фракціях медіального таламуса головного мозку щурів у динаміці вироблення енграм умовно-рефлекторної пам'яті.

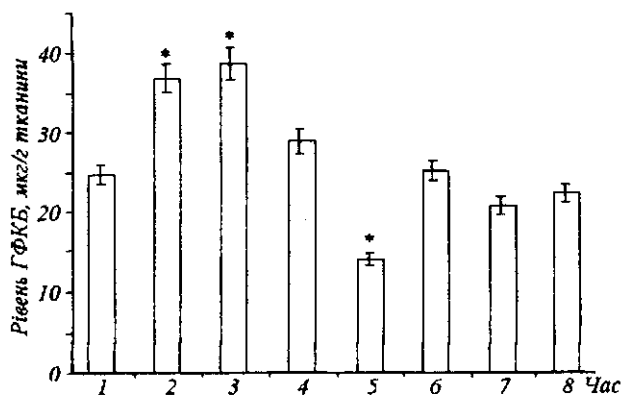
Матеріали і методи. Для дослідження процесів формування енграм умовно-рефлекторної пам'яті у щурів лінії Вістар (масою 190—230 г) використовували умовну реакцію активного уникнення (УРАУ) [16]. Умовну активно-оборонну навичку у щурів виробляли в Y-подібному лабіринті згідно з раніше описаною методикою [17]. Вивчення динаміки показників формування енграм умовно-рефлекторної пам'яті дозволяє простежити за процесом вироблення пам'ятного сліду в перебігу навчання. Щоденно визначали відповідні показники: відносну кількість помилкових реакцій (% помилок), відносну кількість переміщень в освітлений відсік до подачі больового подразника (% УРАУ), частку переміщень в освітлений рукав після дії електроструму (% УРА позбавлення), повний термін переміщення в освітлений відсік лабіринту, латентний термін УРАУ та латентний термін УРА позбавлення. Навчання щурів проводили по шість сесій на тиждень із 10 сполучень умовного і безумовного подразників до досягнення навченості на рівні 95 % спроб.

Усі операції з тканинами мозку контрольних і

піддослідних щурів проводили при температурі 4 °С. Вміст гліального фібрилярного кислого білка у цитоскелетній фракції медіального таламуса визначали через 2 год та 1, 3, 7, 14 і 30 діб після початку вироблення УРАУ. Кількісну оцінку ГФКБ здійснювали методом твердофазного імуоферментного аналізу. Цитоскелетні фракції досліджуваних структур головного мозку контрольних і піддослідних щурів отримували екстракцією буфером А (25 мМ трис-буфер, рН 7,4, 1 мМ фосфометилсульфонілфторид, 10 мМ NaN₃), який містив 4 %-й розчин сечовини. Концентрацію філаментної форми ГФКБ визначали методом імуоферментного аналізу з етапом пригнічення антитіл антигеном у рідкому середовищі [18]. Моноспецифічну антисироватку до ГФКБ отримували за методом [19], яку тестували на специфічність методом перехресного імуоелектрофорезу [3] та імуоблотингу після електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [20]. Кількість ГФКБ виражали в мікрограмах філаментної форми на 1 г тканини медіального таламуса. Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Stat-Win 98 за *t*-критерієм Ст'юдента [21].

Результати і обговорення. У процесі вироблення УРАУ встановлено, що за показниками формування енграм умовно-рефлекторної пам'яті на 30-ту добу експерименту у дослідних щурів спостерігається лише умовна реакція активного уникнення без помилок і умовної реакції активного позбавлення, що свідчить про завершення формування у тварин умовної активно-оборонної навички.

Рівень ГФКБ істотно змінювався у цитоскелетних фракціях медіальної частини таламуса головного мозку в динаміці формування УРАУ. Аналіз змін експресії цього нейроспецифічного білка при виробленні енграм умовно-рефлекторної пам'яті, наведених на рисунку, свідчить про те, що вже через 2 год після першого сеансу навчання вміст філаментної форми ГФКБ у медіальному таламусі дослідних щурів вірогідно підвищився з $24,69 \pm 1,86$ до $36,62 \pm 2,69$ мкг на 1 г тканини. Приріст вмісту ГФКБ на цей період спостережень складав 48 % ($p < 0,05$). Після другого сеансу навчання, тобто через 24 год після початку вироблення УРАУ, концентрація ГФКБ збільшилася в 1,5 разу порівняно з контрольними показниками і набула максимального значення — $38,36 \pm 0,64$ мкг на 1 г тканини.



Концентрація гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у медіальному таламусі головного мозку щурів у динаміці вироблення умовної реакції активного уникнення (у дужках зазначено кількість тварин в серії): 1 — контроль (21); 2 — 2 год (8); 3 — 24 год (8); 4 — 3 доби (8); 5 — 7 діб (8); 6 — 14 діб (7); 7 — 21 доба (11); 8 — 30 діб (8). * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольним значенням

Через 3 доби після початку вироблення у щурів умовно-рефлекторної пам'яті концентрація філаментного ГФКБ у медіальному таламусі знижувалася до $28,59 \pm 1,24$ мкг/г тканини порівняно з попереднім терміном досліджень і вірогідно не відрізнялася від контрольного рівня.

Зростання концентрації ГФКБ спостерігали у медіальній частині таламуса головного мозку щурів і при виробленні умовної реакції пасивного уникнення [22] в амнезованих тварин та тих, що зберегли умовні навички після електрошоку.

Виходячи з того, що астрогліальний білок (ГФКБ) не лише структурно і трофічно підтримує нейрони, але є необхідним у період морфогенезу центральної нервової системи [23] і при формуванні стабільних астроцитарних відростків у відповідь на стимулювання нейронів [24], правомірно припустити, що зміни в експресії ГФКБ можуть відігравати істотну роль в інтегральних процесах мозку і механізмах формування енграм пам'яті.

Через 7 діб після початку навчання вміст нейроспецифічного білка в досліджуваній мозковій структурі продовжує знижуватися і складає 55,6 % від контролю ($p < 0,05$).

На наступній стадії вироблення УРАУ (через 14, 21 та 30 діб) спостерігається підвищення експресії ГФКБ у порівнянні з 7-ю добою експерименту, що ж стосується контролю, то концентрація ГФКБ у мембранній фракції медіального таламуса дослідних щурів істотно не відрізнялася. Визначена нами тенденція до зниження концентрації філа-

ментної форми ГФКБ на 7-му добу навчання може бути зумовлена не лише зміною експресії або деградацією даного нейроспецифічного білка [25], але й переходом його в розчинну форму.

Автори [26] встановили, що в астроцитах відбувається постійний і динамічний перехід ГФКБ від зібраного (філаментного) стану до розібраного (розчинного), а фосфорилування NH_2 -термінальної ділянки ГФКБ спричинює реорганізацію зібраних гліальних філаментів [27]. У роботі [28] знайдено взаємозв'язок між генною експресією ГФКБ і процесами пам'яті у щурів та методом ланцюгової полімеразної реакції ідентифіковано новий ізотип ГФКБ мРНК.

Таким чином, визначене підвищення концентрації філаментної форми ГФКБ у початковий період формування умовно-рефлекторної пам'яті свідчить про те, що саме тоді (через 2 год, 24 год, 3 доби) інтенсивніше протікають процеси пластичних перебудов синаптичних зв'язків у медіальній частині таламуса головного мозку піддослідних щурів, а також про відповідну фізіологічну і нейрохімічну роль нейроспецифічного білка (ГФКБ) у процесах навчання і формування пам'ятного сліду.

A. L. Drozdov, V. I. Chornaya

Changes in the glial fibrillary acidic protein concentration in the medial part of vision tuber under the generation of conditioned reaction of active avoidance

Summary

The changes in concentration of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of glial intermediate filaments in astrocytes of medial part of vision tuber, are studied for the rat brain during generation of conditioned reaction of active avoidance. The increase in GFAP level in membrane fractions of medial part of vision tuber has been shown to be statistically significant in 2 hrs and 24 hrs after the start of training. The data obtained suggest the GFAP participation in the processes connected with learning and memorization.

Key words: learning, memory, glial fibrillary acidic protein.

A. Л. Дроздов, В. И. Черная

Изменения концентрации глиального фибриллярного кислого белка в медиальном таламусе при формировании условной реакции активного избегания

Резюме

Исследованы изменения концентрации маркера промежуточных филаментов цитоскелета астроглиальных клеток — глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) — в медиальном таламусе головного мозга крыс при выработке условной реакции активного избегания (УРАИ). Количественную оценку содержания ГФКБ в цитоскелетных фракциях ткани медиального таламуса проводили методом твердофазного иммунологического анализа через 2 ч и 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут после

начала выработки УРАИ. Достоверное повышение концентрации филаментной формы ГФКБ через 2 ч и в первые сутки после начала обучения с последующим снижением данного показателя до нормы к 30 сут свидетельствует об участии ГФКБ в процессах формирования памятного следа в медиальном таламусе головного мозга крыс на ранних этапах выработки условно-рефлекторной памяти.

Ключевые слова: глиальный фибриллярный кислый белок, условная реакция активного избегания, медиальный таламус, обучение, память.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Нейрохимия* / Под ред. И. П. Ашмарина, П. В. Стукалова.—М.: Изд-во Ин-та биомед. химии РАНН, 1996.—470 с.
2. *Hollis L. A theory of hippocampal function in memory // Hippocampus.*—1996.—6, N 6.—P. 601—602.
3. *Березин В. А., Белик Я. В.* Специфические белки нервной ткани.—К.: Наук. думка, 1990.—263 с.
4. *Певзнер Л. З.* Функциональная биохимия нейроглии.—Л.: Наука, 1972.—200 с.
5. *Дука Т. І., Лециньська І. О., Чорна В. І.* Характеристика гліального фібрилярного кислого білка — компонента астрогліальних проміжних філаментів центральної нервової системи // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 3.—С. 179—185.
6. *Norenberg M.* Astrocytes responses to CNS injury // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*—1994.—N 53.—P. 213—220.
7. *Fuchs E., Weber K.* Intermediate filament: structure, dynamics, function and disease // *Ann. Rev. Biochem.*—1994.—N 63.—P. 345—382.
8. *Лециньская И. А., Дука Т. И., Черная В. И.* Поведенческие реакции крыс и содержание нейроспецифических белков в их мозгу после однократного радиационного воздействия // *Нейрофизиология/Neurophysiology.*—2000.—32, № 1.—С. 22—28.
9. *McCall M., Gregg K., Behringer R., Pollenz R.* Targeted deletion in astrocyte intermediate filaments (GFAP) alters neuronal physiology // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 6361—6367.
10. *Mitchison T.* Evolution of a dynamic cytoskeleton // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B.*—1995.—349.—P. 299—304.
11. *Shibuki K., Gomi H., Chen L., Bao S.* Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice // *Neuron.*—1996.—16.—P. 587—599.
12. *Styren S., Kamboh M., DeKocky S.* Expression of differential immune factors in temporal cortex and cerebellum: the role of alpha-1-antichymotrypsin, apolipoprotein E, and reactive glia in the progression of Alzheimer's disease // *J. Comp. Neurol.*—1998.—13.—P. 511—520.
13. *Day J., Laping N., McNeill T., Scheibers S., Posinetti G., Finch C.* Castration enhances expression of glial fibrillary acidic protein and sulfated glycoprotein-2 in the intact and lesion-altered hippocampus of the adult male rat // *Mol. Endocrinol.*—1990.—N 4.—P. 1995—2002.
14. *Rutka J., Marakami P., Dirks P.* Role of glial filament in cell and tumors of glial origin: a review // *J. Neurosurg.*—1997.—N 87.—P. 420—430.
15. *Rougent M., Araud D., Seite R., Prochiantz A., Auttillo-Touati A.* Astrocyte-regulated synaptogenesis — an *in vitro* ultrastructural study // *Neurosci. Lett.*—1993.—150.—P. 83—88.
16. *Кругликов Р. И.* Нейрохимические механизмы обучения и памяти.—М.: Наука, 1981.—211 с.
17. *Дроздов А. Л., Дзяк Л. А., Черная В. И.* Изменения концентрации нейроспецифического белка NCAM во фронтальной зоне неокортекса при выработке условного активно-оборонительного навыка // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 5.—С. 442—444.
18. *Ibsen S., Bererin V., Norgaard-Pedersen B., Bock E.* Enzymelinked immunosorbent assay of D2-glycoprotein // *J. Neurochem.*—1983.—41.—P. 356—362.
19. *Антитела. Методы* / Под ред. Д. Кетти.—М.: Мир, 1991.—381 с.
20. *Недзвецкий В. С., Березин В. А., Оберняк Т. И., Жмарева Е. Н.* Характеристика специфических белков промежуточных филаментов в опухолях головного мозга человека // *Биохимия.*—1986.—№ 51.—С. 1843—1850.
21. *Лакин Г. Ф.* Биометрия.—М.: Высш. шк., 1990.—352 с.
22. *Дзяк Л. А., Дука Т. І., Дроздов О. Л., Чорна В. І.* Гліальний фібрилярний кислий білок у структурах мозку щурів при виробленні пасивно-оборонного навичку // *Нейрофизиология/Neurophysiology.*—1998.—31, № 4.—С. 348—350.
23. *Keyser D., Pellmar T.* Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cell // *Glia.*—1994.—10.—P. 237—243.
24. *Chamak B., Fellous A., Glovinski J., Prochiantz A.* MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are co-regulated through region specific neuro-astroglial interaction // *Neuroscience.*—1987.—7.—P. 3163—3170.
25. *Armond S., Fajardo M., Naughton S., Eng L.* Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: an electroblot study // *Brain Res.*—1983.—262, N 2.—P. 275—282.
26. *Nakamura J., Takeda M., Angelides K., Nishiyama K.* Assembly, disassembly, and exchange of glial fibrillary acidic protein // *Glia.*—1991.—4.—P. 101—110.
27. *Noetzel M.* Phosphorylation of the glial fibrillary acidic protein // *J. Neurosci. Res.*—1990.—27.—P. 184—192.
28. *Huang M., Lee E.* Identification of a novel glial fibrillary acidic protein mRNA isotype related to memory retention in rats // *Neuroreport.*—1997.—68, N 7.—P. 1619—1624.

УДК 577.112 + 612.812.2
Надійшла до редакції 04.12.03