

УДК 577.156 : 612.015 + 576.311

В. С. Недзвецький

Дніпропетровський національний університет

ВПЛИВ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ НА ЕКСПРЕСІЮ НЕРВОВОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ І МНЕСТИЧНІ ФУНКЦІЇ ЦНС

Досліджено вплив СТЗ-діабету на експресію NCAM і астроцитарну реактивність за допомогою визначення астрогліального маркерного фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у різних регіонах мозку.

Influence of STZ-diabetes on the NCAM expression and astrocytic reactivity was studied with the help of determination of astroglial marker fibrous acidic protein in different brain areas.

Вступ

Специфічні білки нейронів і глії визначають особливості функціонування окремих клітинних компонентів ЦНС та їх взаємодію як у нормі, так і при різних патологічних розладах. На сьогоднішній день функції нервовоспецифічних білків (НСБ) у вищій нервовій діяльності, розвитку нейропатії залишаються вивченими недостатньо для розуміння зв'язку між молекулярними змінами та модуляцією фізіологічних процесів нервових клітин [1]. Міжклітинна адгезія надзвичайно важлива для процесів розвитку, диференціації та функціонування клітин нервової системи.

Молекула адгезії нервових клітин (NCAM) грає важливу роль в ембріогенезі нервової системи, проростанні нейритів, формуванні та функціонуванні синапсів [2]. Білки цитоскелета відіграють важливу роль у таких життєво важливих процесах, як аксональний транспорт, забезпечення стабільної морфології, модуляції руху астроцитів та їх відростків, проростання нейритів у процесах розвитку та репарації ушкоджень [10]. Гістоспецифічним компонентом проміжних філаментів цитоскелета астроцитів є гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) [3]. Роль НСБ у нейродегенеративних процесах і відновленні пошкоджень залишається не з'ясованою.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на щурах лінії Wistar (статевозрілі самці, 14–16 тижнів). Тварини були розділені на дві групи ($n = 12$). Тваринам першої групи одноразово вводили інтраперитонеально СТЗ у дозі 5 мг/кг. Тварини контрольної групи отримували фізіологічний розчин у тому ж об'ємі. Процес навчання оцінювали у водному тесті Мориса через 21 добу після введення СТЗ [5].

Фракції розчинних, цитоскелетних і мембранних білків одержували з тканин гіпокампу, кори і мозочка за 28 діб після ін'єкції СТЗ, як описано раніше. ДСН-ПААГ електрофорез проводили в градієнті поліакриламіді 7,5–17,5 % за Лаемлі [7]. Визначення поліпептидного складу ГФКБ проводили методом імуноблотингу з ви-

© Недзвецький В. С., 2005

користанням моноспецифічної антисироватки, як описано раніше [9]. Вміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера [11]. Визначення відносної інтенсивності поліпептидних зон проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу.

Результати та їх обговорення

Результати виміру часу, за який тварини знаходили підводну платформу у водному тесті Мориса, представлені на рис. 1. У контрольній групі тварин час становив $8 \pm 1,6$ с, а у групі СТЗ-діабетичних щурів – $26 \pm 4,3$ с. Таке значне збільшення часу у виконанні завдань тесту свідчить про розвиток пізнавального дефіциту в групі діабетичних щурів.

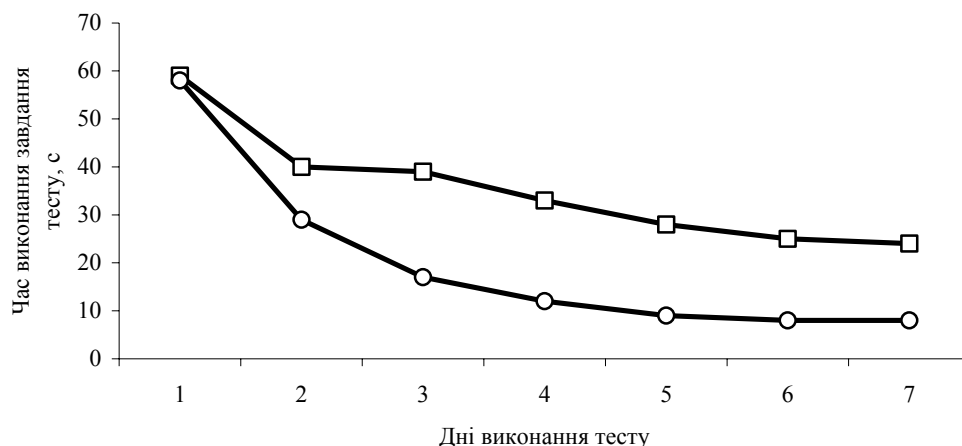


Рис. 1. Результати вимірювання часу виконання завдань тесту Мориса щурами контрольної (○) і СТЗД (□) груп

Рівень ГФКБ і поліпептидний склад визначали у білкових фракціях гіпокампу, кори великих півкуль і мозочка. Зміни поліпептидного складу та значне збільшення вмісту ГФКБ виявлено у всіх трьох відділах мозку. У мозку щурів через 21 день після ін'єкції СТЗ методом імуноблотингу виявили підвищення вмісту деградованих поліпептидів 42–47 кДа. Найбільш інтенсивні продукти деградації цитоскелетної фракції ГФКБ (35–37 кДа) виявлені в мозочку та гіпокампі групи діабетичних щурів. У мозочку цієї групи виявлене збільшення вмісту ГФКБ ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою (рис. 2). Зміни цитоскелетного білка ГФКБ у мозочку відображають загальні риси метаболічного розладу в астрогліальних клітинах при СТЗ-індукованому діабеті. У корі великих півкуль визначено значне збільшення продуктів деградації ГФКБ, що свідчить про інтенсивні цитоскелетні перебудови.

ГФКБ – головний компонент цитоскелета астроцитів, що обумовлює характерну для цього гліального типу зірчасту форму. Зміни вмісту й поліпептидного складу білка гліальних проміжних філаментів свідчать про реактивний астрогліоз у відповідь на метаболічні порушення, які індукуються СТЗ. Реактивний астрогліоз швидко розвивається після ушкоджень мозку різної природи. Гліоз супроводжується інтенсивною проліферацією та диференціацією астроцитів [13]. Характерною ознакою цих подій є підвищення експресії ГФКБ.

Вплив екстремальних концентрацій глюкози, гострої гіпоглікемії і хронічної гіперглікемії веде до метаболічних порушень. Унаслідок метаболічного та васкулярного розладів діабет викликає значні ушкодження ЦНС, наприклад, інсульт. Однак присутні й менш помітні зміни в мозку, зокрема, дефіцит пізнавальної активності [8]. Діабет асоційований з енцефалопатією, що характеризується

Діабет асоційований з енцефалопатією, що характеризується повільною прогресією і клінічно значним пізнавальним дефіцитом.

У тваринних діабетичних моделях погіршення просторового навчання відбувається одночасно зі змінами гіпокампальної синаптичної пластичності, а також балансу вторинних месенджерів [14].

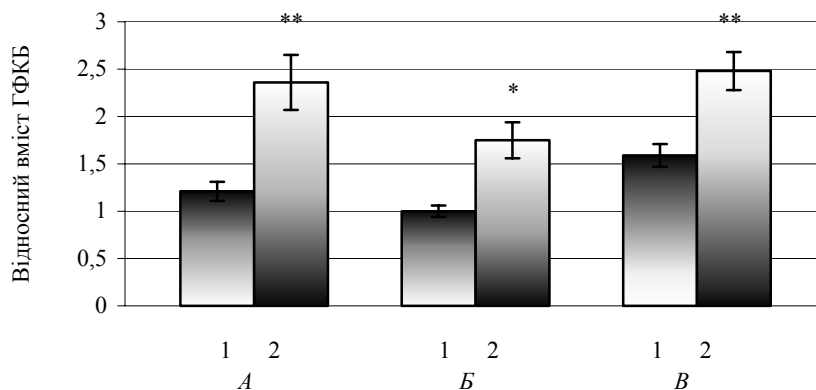


Рис. 2. Відносний вміст цитоскелетної фракції ГФКБ у гіпокампі (А), корі великих півкуль (Б), мозочка (В): 1 – контроль; 2 – СТЗД група щурів; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ відносно контрольної групи ($n = 3 \times 12$)

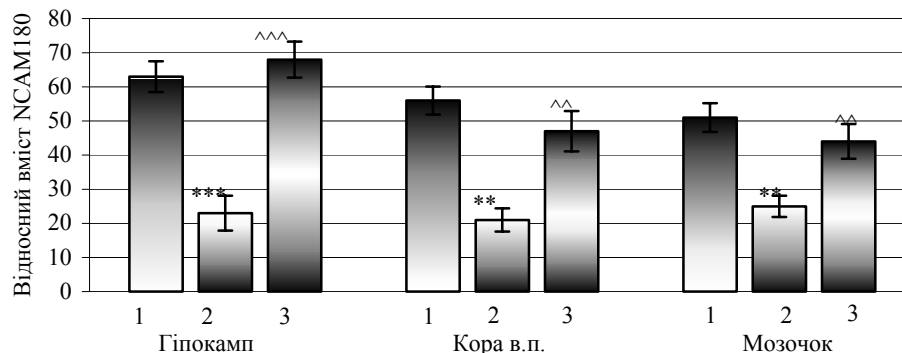


Рис. 3. Відносний вміст ізоформи NCAM180 у мозку щурів: 1 – контрольна група; 2 – група СТЗД щурів; 3 – група СТЗД щурів, які отримували курсові ін'єкції мелатоніну; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно контрольної групи; ^^ – $p < 0,01$; ^^^ – $p < 0,001$ відносно групи 2 ($n = 3 \times 12$)

Визначений дисбаланс вмісту ізоформ NCAM180 свідчить про порушення експресії цього білка. Відносний вміст NCAM180 у гіпокампі і корі великих півкуль у групі щурів з СТЗД був вірогідно знижений ($p < 0,001$ і $p < 0,01$ відповідно) порівняно з контрольною групою. Враховуючи те, що адгезивні молекули підтримують цілісність міжнейронних синаптичних контактів і взаємодію нейронів із гліальними клітинами, можна передбачити певну роль NCAM у патогенезі діабетичної нейропатії. Порушення адгезивних зв'язків відбивається на здатності нервової системи до пластичних перебудов, формування функціонально значимих синапсів. Таким чином, виявлене нами зниження NCAM180 у групі діабетичних щурів може бути частиною патогенетичного процесу розвитку пізнавального дефіциту.

З огляду на представлені результати, можна припустити, що порушення утилізації глюкози викликає розвиток астрогліозу, погіршує пластичність синаптичних

контактів зрілої нервової системи і веде до розвитку пізнавального дефіциту. Виявлені зміни в експресії гліального (ГФКБ) і нейронального (NCAM) маркерів, а також розвиток пізнавального дефіциту при СТЗД свідчать про зв'язок порушень метаболізму даних НСБ з вищою нервовою діяльністю.

Бібліографічні посилання

1. **Недзвецкий В. С.** Влияние мелатонина на познавательную способность и экспрессию молекулы адгезии нервных клеток NCAM при стрептозототин-индуцированном диабете / В. С. Недзвецкий, П. А. Неруш, С. В. Кириченко // *Neurophysiology / Нейрофизиология*. – 2003. – Т. 35, № 6. – С. 463–469.
2. **Altered expression** of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / G. Baydas, V. S. Nedzvetskii, P. A. Nerush et al. // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 73. – P. 1907–1916.
3. **Baydas G.** Altered glial acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 33. – P. 1–6.
4. **Behavioural correlates** of striatal glial fibrillary acidic protein in the 3-nitropropionic acid rat model: disturbed walking pattern and spatial orientation / C. E. Teunissen, H. W. Steinbusch, M. Angevaren et al. // *Neurosci.* – 2001. – Vol. 105, N 1. – P. 153–167.
5. **Biessels G. J.** The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy // *Life Sci.* – 1996. – Vol. 59. – P. 379–387.
6. **Comparative pharmacological studies** of melatonin receptors MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2 / O. Noslean, J. P. Nicolas, F. Klupsh et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 61, N 11. – P. 1369–1379.
7. **Coyle J. T.** Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders / J. T. Coyle, P. Puttfarcken // *Science*. – 1993. – Vol. 262, N 1. – P. 689–695.
8. **Free radical-mediated molecular damage.** Mechanisms for the protective actions of melatonin in central nervous system / R. J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, D. X. Tan, S. Burkhardt // *Ann. of the N.Y. Acad. of Sci.* – 2001. – Vol. 939. – P. 200–215.
9. **Gispen W. H.** Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus / W. H. Gispen, G. J. Biessels // *Trends Neurosci.* – 2000. – Vol. 23, N 2. – P. 542–549.
10. **Increase** of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E / G. Baydas, V. S. Nedzvetskii, M. Tuzcu et al. // *European J. of Pharmacol.* – 2003. – Vol. 462. – P. 67–71.
11. **Laemmli O. H.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 1. – P. 243–246.
12. **Litvin O. O.** Mechanisms of memory reorganization during retrieval of acquired behavioral experience in chicks: the effects of protein synthesis inhibition in the brain / O. O. Litvin, K. V. Anokhin // *Neurosci Behav. Physiol.* – 2000. – Vol. 30, N 6. – P. 671–678.
13. **Miller G. L.** Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31, N 5. – P. 964–966.
14. **Reactive astrocytes:** cellular and molecular cues to biological function / J. L. Ridet, S. K. Malhotra, A. A. Privat et al. // *Trends Neurosci.* – 1997. – Vol. 20, N 12. – P. 570–577.
15. **Sharma M.** Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment / M. Sharma, Y. K. Gupta // *Life Sci.* – 2001. – Vol. 68. – P. 1021–1029.

Надійшла до редколегії 10.09.05.