

В.С. Недзвецкий

Стан гліальних проміжних філаментів і здатність до навчання у щурів при експериментальному діабеті

Исследовали влияние стрептозотоцин-индуцированного диабета на состав глиальных промежуточных филаментов и процесс обучения крыс. Результаты водного теста Морриса показали значительный познавательный дефицит в группе крыс с диабетом. В этой же группе выявлено увеличение деградации глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) и возрастание общего количества ГФКБ во всех исследованных отделах. Представленные результаты свидетельствуют о том, что диабет индуцирует изменения активности ГФКБ-положительных глиальных клеток. Подобные глиальные клетки могут являться важными функциональными элементами пластичности нервной системы. Корреляция результатов иммуноблотинга и теста Морриса подтверждает, что ухудшение обучения и памяти сопровождается реконструкцией глиального цитоскелета.

ВСТУП

Останнім часом значно підвищилося число захворювань, провідними симптомами яких є порушення пам'яті. Причиною цього можуть бути травми мозку, нерво-психічні розлади, судинні та метаболічні патології. Нині невідомі молекулярні основи складної поведінки, що здатні поєднувати молекулярні перебудови з фізіологією поведінки. Відомо, що погіршення навчання та просторової пам'яті спостерігається у тварин з модельованим діабетом, індукованим стрептозотоцином. Цей вид діабету супроводжується пригніченням утилізації глюкози та призводить до інгібування метаболічної здатності нейронів і гліальних клітин, що у свою чергу є причиною нейродегенеративних змін [1].

Діабет (*Diabetes mellitus*) – захворювання, що характеризується гіперглікемією в результаті дефіциту секреції інсуліну чи його дії, а також обох цих факторів одночасно. Діабет асоційований з пізнавальним дефіцитом, підвищеним ризиком

деменцій, особливо в похилому віці. Подібні дефіцити супроводжуються нейрофізіологічними та структурними змінами в мозку [2]. Припускають, що діабет взаємопов'язаний з васкулярною деменцією так само, як і хвороба Альцгеймера [3]. Значне зниження утилізації глюкози, що спостерігається в мозку при старінні, а також у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, асоційовано з пізнавальним дефіцитом. Ці спостереження підтверджують гіпотезу про те, що пізнавальна дисфункція пов'язана з редукцією метаболізму глюкози [4].

Експериментальні дослідження підтверджують активну участь гліальних клітин в інтегративних процесах нервової системи. Астроцити мають фізіологічні та метаболічні властивості, які відіграють життєво важливу роль у підтримці нормального гомеостазу в мозку. Вони також беруть активну участь у нейрональному розвитку й інтеграції мозкових функцій, включаючи напрямок росту нейритів, структурну та функціональну підтримку нейронів [5].

© В.С. Недзвецкий

Пізнавальний дефіцит корелює з порушенням метаболізму глюкози при індукованому стрептозотоцином діабеті. Подібна модель зручна для вивчення нейродегенеративних змін, що супроводжують діабет.

Метою нашого дослідження було вивчення дії стрептозотоцину на процес навчання й астроцитарну реактивність через визначення астроцитарного маркера гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у різних структурах мозку.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах лінії Вістар (статевозрілі самці, 14–16 тиж). Тварин було розділено на дві групи по вісім у кожній. Тваринам дослідної групи одноразово вводили інтраперитонеально стрептозотин у дозі 5 мг/кг. Процес навчання оцінювали у водяному тесті Мориса через 21 добу після введення препарату [6]. Тварини контрольної групи отримували фізіологічний розчин у тому ж об'ємі.

Фракції розчинних, цитоскелетних і мембранних білків одержували з тканин гіпокампа, кори та мозочка за 28 діб після ін'єкції стрептозотоцину. Тварин декапітували, вилучали головний мозок, охолоджували і розділяли на відділи. Тканини (0,2 г) гомогенізували в 2,0 мл 0,025 моль/л тріс-буфера (рН 8,0), що містив 2 ммоль/л ЕДТА, 1 ммоль/л 2-меркаптоетанолу, 0,1 ммоль/л фенілметил-сульфонілфториду і соєвий інгібітор трипсину (10 мкг/мл). Гомогенат центрифугували при 60000 g протягом 60 хв. Супернатант (S_1) містив розчинні білки. Першу частину отриманого осаду ресуспендували в 0,6 мл того ж буфера, що додатково містив 2% Тритону X-100, який ефективно солюбілізує мембранні білки. Другу частину осаду ресуспендували в 0,8 мл того самого буфера, котрий додатково містив 4 моль/л сечовину, що сприяє солюбілізації цито-

скелетних білків. Потім повторно центрифугували за тих самих умов. ДСН-ПААГ електрофорез проводили в градієнті поліакриламід у 7,5 – 17,5 % [7]. Визначення поліпептидного складу ГФКБ проводили методом імуноблотингу з використанням моноспецифічної антисироватки [8]. Вміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера [9]. Визначення відносної інтенсивності поліпептидних зон проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольній групі тварин час, за який вони знаходили підводну платформу у водяному тесті Мориса, становив $8 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}$, а у дослідній групі – $26 \text{ с} \pm 4,3 \text{ с}$ (рис. 1). Значне (3,2 раза) збільшення часу у виконанні задач тесту свідчить про розвиток пізнавального дефіциту в групі щурів з діабетом.

Рівень ГФКБ і поліпептидний склад визначали в трьох білкових фракціях (розчинній, цитоскелетній і Тритон X-100-екстрагованій) гіпокампа, кори великих півкуль і мозочка. Зміни поліпептидного складу і значне збільшення вмісту розчинної форми ГФКБ виявлено у всіх трьох відділах мозку.

У мозку щурів через 21 добу після ін'єкції стрептозотоцину методом імуноблотингу виявили підвищення вмісту деградованих поліпептидів 42–47 кДа у всіх досліджуваних фракціях. Найбільш інтенсивні продукти деградації цитоскелетної фракції ГФКБ (35–37 кДа) виявлено в мозочку і гіпокампі щурів дослідної групи (рис. 2). У мозочку цієї групи спостерігалось збільшення вмісту ГФКБ у тритонівій фракції ($P < 0,01$), цитоскелетній ($P < 0,05$) а також загального вмісту ГФКБ ($P < 0,001$) порівняно з контрольною групою. Зміни цитоскелетної фракції ГФКБ у мозочку,

можливо, відображають загальні риси метаболічного розладу в астрогліальних клітинах при індукованому стрептозотоцином діабеті. У корі великих півкуль спостерігали незначні зміни вмісту ГФКБ у розчинній фракції, але водночас у цитоскелетній фракції виявлено значне збільшення продуктів деградації ГФКБ, що свідчить про інтенсивні цитоскелетні перебудови.

ГФКБ є головним компонентом цитоскелета астроцитів і зумовлює характерну для цього гліального типу зірчасту форму. Астрогліальна клітинна відповідь (астрогліоз) активується фізичними, хімічними або метаболічними ушкодженнями мозку і супроводжується інтенсивною проліферацією та диференціацією астроцитів [10]. Остання характеризується підвищенням синтезу ГФКБ. Зміни вмісту та поліпеп-

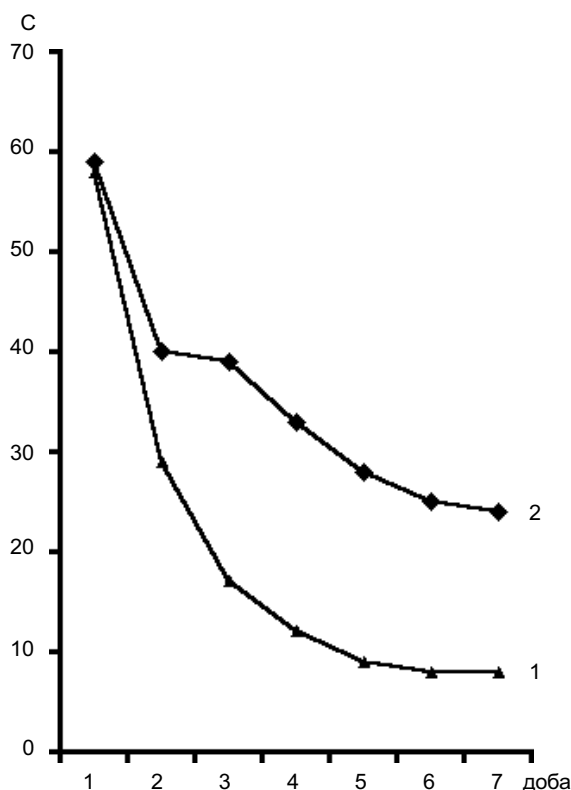


Рис. 1. Результати водяного тесту Мориса протягом 7 діб: 1 – контрольна група; 2 – група тварин, хворих на діабет

тидного складу білка гліальних проміжних філаментів свідчать про реактивний астрогліоз у відповідь на метаболічні порушення, які індукуються стрептозотоцином.

Існують різні методи експериментальної індукції діабету, однак найбільш широко використовується інтраперитонеальне введення цитотоксичного агента – стрептозотоцину. Складова стрептозотоцину глюкозамін-нітрососечовина діє на глюкозний GLUT-2 транспорт, що наявний у високих концентраціях в інсулінпродукуючих клітинах. Цитотоксичний ефект стрептозотоцину опосередкований зниженням рівня НАД і формуванням внутрішньоклітинних вільних радикалів, що ведуть до розривів ДНК-ланцюгів. Оскільки β -клітини мають низький вміст НАД, вони є уразливими до дії стрептозотоцину. Глюкозний GLUT-2 переносник відсутній у клітинах спинномозкового бар'єра і таким чином виключається прямий вплив стрептозотоцину на мозок. Гризуни з індукованим стрептозотоцином діабетом є гіпоінсулінімічними, але не потребують введення інсуліну для виживання [11]. Як і у людини, у таких тварин розвивається ураження очей, нирок, міокарда, кровоносних судин і нервової системи. Ці тварини розглядаються як адекватна модель вивчення нейродегенеративних змін, що відбуваються внаслідок метаболічних розладів чи дії стресорних факторів.

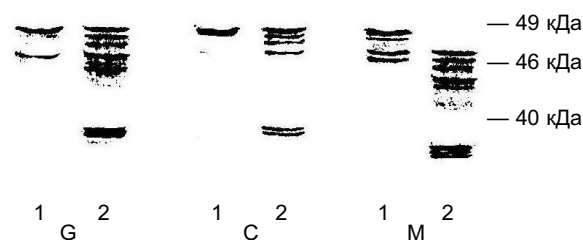


Рис. 2. Імуноблотинг філаментної фракції гліального фібрилярного кислого білка з гіпокампа (G), кори великих півкуль (C) і мозочка (M) мозку контрольної (1) і дослідної (2) груп

Вплив екстремальних концентрацій глюкози, гострої гіпоглікемії та хронічної гіперглікемії призводить до метаболічних порушень. Унаслідок метаболічного і васкулярного розладів діабет викликає значні ушкодження ЦНС, наприклад, інсульт. Однак є і менш помітні зміни в мозку зокрема, дефіцит пізнавальної активності [12].

Багатофакторіальний патогенез діабетичної енцефалопатії залишається не зовсім зрозумілим, однак результати недавніх досліджень дозволяють виділити три основні компоненти – прямий нейротоксичний ефект гіперглікемії, цереброваскулярні та нейромодуляторні зміни. Діабет асоційований з енцефалопатією, що характеризується повільною прогресією і клінічно значним пізнавальним дефіцитом.

У тварин з модельованим діабетом відбувається погіршення просторового навчання одночасно зі змінами гіпокампальної синаптичної пластичності, а також балансу вторинних месенджерів [13]. У просторово-предметному тесті щури з індукованим діабетом виявляють пізнавальний дефіцит у різних варіаціях тесту, при цьому переключення між завданнями і підвищення їхньої комплексності підкреслює нездатність хворих щурів адаптувати поведінкову стратегію у виборі правильного варіанта [14].

Гіперглікемія стимулює переключення на “поліольний шлях”, у якому надлишок глюкози конвертується в сорбітол і фруктозу. Підвищення вмісту сорбітолу порушує фосфоінозитидний метаболізм, що призводить до змін активності протеїнкінази С. У щурів з діабетом виявлено підвищення активності протеїнкіназ А та С, а також зниження активності кальцій-кальмодулінзалежної протеїнкінази II [15]. Надлишок глюкози також відображається на кальцієвому гомеостазі, дисбалансі генерації та зниженні реактивних сполук кисню, виникненні оксидативного стресу [16].

Стресові фактори різної природи можуть сприяти появі оксидативних порушень у нервовій тканині. Останнім часом була показана асоціація порушень вмісту малонового діальдегіду та глутатіону з підвищенням експресії ГФКБ у мозку щурів, які знаходилися при постійному освітленні [17]. За умов оксидативного стресу виявлено кореляцію між підвищенням концентрації ГФКБ у стріатумі та порушенням просторової орієнтації у щурів зі штучною мітохондріальною дисфункцією [6].

Гліальні клітини безпосередньо беруть участь у контролі нейрональної активності та синаптичної передачі, а астроцити – у регуляції ГАМК-ергічної передачі [18]. Гліальні клітини здатні конвертувати глутамат у глутамін. Гліальні транспортери глутамату більш потужні, ніж у нейронів. Гліальні клітини швидко інактивують глутамат, який виходить з синапсів після стимуляції. Тільки в клітинах глії є центральний фермент глутамінсинтетаза, який бере участь у поверненні захопленого глутамату нейронам через амінування його до глутаміну, який не має нейротоксичної властивості [19]. Глія також синтезує два інших важливих фермента – піруваткарбоксилазу, що бере участь у синтезі *de novo* карбонового скелету глутамату і так званий малік-ензим, який повертає надмірну кількість глутамату у метаболічні шляхи окиснення глюкози [20]. Таким чином, астроцити захищають нейрони від екситотоксичної загибелі.

Астроцити синтезують широкий спектр нейротрофічних факторів, які стимулюють проростання нейритів і формування нейрональних зв'язків [21]. На підвищення активності нейронів астроцити відповідають підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що призводить до виходу з гліальних клітин медіаторів, які викликають зворотну регуляцію актив-

ності нейронів. Порушення діяльності ГФКБ-позитивних клітин може відігравати важливу роль у генезі нейродегенеративних процесів. Вплив діабету на процес навчання може бути зумовлений змінами рівня проліферації клітин у гіпокампі [22].

Зміни вмісту ГФКБ у мозку тварин з діабетом свідчать про розвиток астрогліозу, що супроводжується активною проліферацією та диференціацією лише окремих субпопуляцій гліальних клітин. Астрогліоз спричинює значні зміни в функціонуванні як безпосередньо гліальних клітин, так і нейронів, оскільки астроцити контролюють їх оточення [5].

Цитоскелетна фракція містить, в основному, нерозчинний філаментний ГФКБ. Розчинна та тритонна фракції – цитоплазматичний і асоційований з мембранними структурами ГФКБ. Усі три фракції є функціонально зв'язаними і по-різному регулюються під час астрогліальної відповіді на метаболічне пошкодження стрептозотоцином. У нашій роботі ми оцінювали зміни ГФКБ усіх трьох фракцій за умов експериментального діабету. Розуміння молекулярних механізмів розвитку діабетичної енцефалопатії дозволить гальмувати або обмежити прискорений пізнавальний спад у пацієнтів з діабетом.

Отримані результати показують, що діабет призводить до підвищення вмісту ГФКБ у різних відділах мозку, а також до розвитку пізнавального дефіциту за 21-шу добу після введення стрептозотоцину. Більше того, порушення метаболізму глюкози індукує посилену деградацію ГФКБ. Реактивна гліальна відповідь характеризується інтенсивним фібрилогенезом і підвищенням експресії ГФКБ. Підвищення експресії останніх розглядається як маркер гліальних ушкоджень. Вміст ГФКБ пропонується використовувати як показник мозкової травми при діабетичній енцефалопатії.

V.S. Nedzvetsky

THE STATE OF GLIAL INTERMEDIATE FILAMENTS AND LEARNING OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES

The effect of streptozotocin-induced diabetes on glial intermediate filament and behavioral reactions of rats was investigated. The water Morris test shows cognitive deficit in diabetic rats. The results of an immunoblot show both an increase in GFAP degradation and an increase in common GFAP amount in the brain of diabetic rats. The observations presented here suggest that diabetes induces the changes in activity of GFAP-positive glial cells. Such glial cells may be considered a key element in plasticity of nervous system. These results suggest that the impairment of learning and memory is accompanied by glial cytoskeletal reconstruction.

Dnepropetrovsk National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Недзвєцький В.С., Березин В.А., Оберняк Т.И., Жмарева Е.Н. Характеристика специфических белков промежуточных филаментов в опухолях головного мозга человека // Биохимия. – 1986. – **51**, № 11. – С. 1843 – 1850.
2. Baydas G., Reiter R.J., Nedzvetskii V.S. et al. Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin // *J. Pineal Res.* – 2002. – **33**. – P. 1 – 6.
3. Bergles D.E., Jahr C.E. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes // *Neuron.* – 1997. – **19**, № 6. – P. 1297 – 1308.
4. Biessels G. J. The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy // *Life Sci.* – 1996. – **59**. – P. 379 – 387.
5. Biessels G.J., Kamal A., Ramakers G.M. et al. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats // *Diabetes.* – 1996. – **45**, № 9. – P. 1259 – 1266.
6. Dihne M., Block F., Korh H., Topper R. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury // *Brain Res.* – 2001. – **902**, № 2. – P. 178 – 189.
7. Gispen W.H., Biessels G- J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus // *Trends Neurosci.* – 2000. – **23**. – P. 542 – 549.
8. Hertz L., Dringen R., Robinson S.R. Astrocytes: glutamate producers for neurons // *Neurosci. Res.* – 1999. – **57**, № 4. – P. 317 – 428.
9. Jackson-Guilford J., Leander J.D., Nisenbaum L.K. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus // *Neurosci. Lett.* – 2000. – **293**, № 2. – P. 91 – 94.
10. Laemmli O.H. Cleavage of structural proteins during the

- assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, № 1. – P. 243–246.
11. Meneilly G.S., Tessier D. Diabetes in elderly adults // J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. – 2001. – **56**, № 1. – P. 5–13.
 12. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. – 1959. – **31**, № 5. – P. 964–966.
 13. Minelli A., De Biasi S., Brecha N.C. et al. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABA-ergic synapses in the cerebral cortex // J. Neurosci. – 1996. – **16**, № 19. – P. 6255–6264.
 14. Popovic M., Biessels G.J., Isaacson R.L. et al. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial-object discrimination task // Behav. Brain Res. – 2001. – **122**, № 2. – P. 201–207.
 15. Prockaerts J., Fahrig T., Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis // Behav. Brain Res. – 1999. – **102**. – P. 73–88.
 16. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function // Trends Neurosci. – 1997. – **20**, № 12. – P. 570–577.
 17. Rubio N. Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using non-catalytic gp95 receptor // Europ. J. Neurosci. – 1997. – **9**, № 9. – P. 1847–1853.
 18. Sharma M., Gupta Y.K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment // Life Sci. – 2001. – **68**. – P. 1021–1029.
 19. Schnedl W.J. et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells // Diabetes. – 1994. – 43. – P. 1326–1333.
 20. Smith M.A. et al. Radical AGEing in Alzheimer's disease // Trends Neurosci. – 1995. – **18**. – P. 172–176.
 21. Sredy J., Sawicki D.R., Notvest R.R. Polyol pathway activity in nervous tissues of diabetic and galactose-fed rats: effect of dietary galactose withdrawal or tolrestat intervention therapy // J. Diabet. Complic. – 1991. – **5**, № 2. – P. 42–47.
 22. Teunissen C.E., Steinbusch H.W., Angevaren M. et al. Behavioural correlates of striatal glial fibrillary acidic protein in the 3-nitropropionic acid rat model: disturbed walking pattern and spatial orientation // Neurosci. – 2001. – **105**, № 1. – P. 153–167.