

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОНОАМИНОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ АСТРОЦИТАРНОГО КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛА

Ставцев Д.Д. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия),
к.т.н. Маковик И.Н. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)
Научные руководители – д.б.н., профессор Абрамов А.Ю.
(Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)
к.т.н., доцент Дунаев А.В.
(Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)

Аннотация Работа посвящена изучению влияния адреналина и селегилин на изменение кальциевого сигнала.

Введение. В настоящее время научные исследования свидетельствуют о том, что активные формы кислорода (АФК), образующиеся в митохондриях, регулируют разнообразные физиологические параметры как в обычных условиях, так и при воздействии на клетку патогенных факторов. Повышенная генерация АФК митохондриями является одним из основных механизмов развития тяжелых функциональных и морфологических нарушений, возникающих в условиях гипоксии, ишемии и реперфузии, что характерно при инсультах, инфарктах, посттравматической болезни, а также играют определенную патогенетическую роль в нейродегенеративном процессе и в значительной степени ускоряют клиническое проявление генетической предрасположенности к дегенеративному процессу. Ингибирование дыхания гипоксией вызывает продукцию АФК, которая приводит к перекисному окислению липидов, активацию фосфолипазы С и генерированию IP₃-зависимого кальциевого сигнала. Распространение астроцитарного кальциевого сигнала стимулирует дыхательную активность в ответ на гипоксию. В работе проведена демонстрация возможности оценки способности вещества выступать в качестве ингибитора MAO по изменению кальциевого сигнала.

Основная часть. Работы выполнены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики, а также одобрены этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Исследования проводились на срезах коры головного мозга крыс линии Wistar (возраст 2 месяца), содержащих неповрежденные разрезом сосуды. Для анализа изменений концентрации внутриклеточного кальция использован флуоресцентный индикатор кальция Fluo-4 AM (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Активация передачи кальциевого сигнала осуществлялась с применением моноамина Adrenaline. В качестве блокатора действия моноаминоксидазы (MAO) в астроцитах применялся ингибитор MAO селегилин.

Оценку кальциевого сигнала осуществляли по изменению базового уровня флуоресценции и диаметра кровеносных сосудов с применением специально разработанной экспериментальной установки. Оптическая схема установки включала в себя планарный апохроматический объектив Mitutoyo M Plan APO 5X (Thorlab etc, США) и двояковыпуклую линзу с фокусным расстоянием 200 мм. Для регистрации изображений использовалась ПЗС-камеры Thorlabs 340M-USB (Thorlabs etc, США). Для возбуждения флуоресценции клеточного зонда использовался светодиодный источник излучения Thorlabs M455F1

(Thorlabs etc, США) с центральной длиной волны 455 нм, излучение от которого направлялось на исследуемый объект непосредственно через объектив при помощи дихроичного светофильтра Thorlabs MD480 (Thorlabs etc, США). Для ограничения попадания возбуждающего излучения на матрицу в приёмном канале установки был применён длинноволновой светофильтр Thorlabs FGL495 (Thorlabs etc, США).

В процессе проведения исследования срезы были разделены на две группы и помещены в ячейки с 150 мкл солевого раствора Хэнкса. В начале каждого эксперимента, до внесения адреналина и ингибитора МАО селегилина, производилась регистрация фоновой флуоресценции длительностью 1 мин. После этого в группе №2 в ячейку вносили 5 мкл ингибитор МАО и продолжали регистрацию данных в течение 1 мин, после чего вносили 5 мкл адреналина (концентрация в ячейке 20 мкМ) и продолжали регистрацию изображений в течение ещё 4 мин. В группе №1 по истечении 1 мин записи фоновой флуоресценции сразу вносили 5 мкл адреналина и осуществляли запись в течение 4 мин.

Выводы. Анализ данных выявил повышение уровня флуоресценции и изменение просвета исследуемого сосуда в ответ на действие адреналина в обеих исследуемых группах. При этом в присутствии ингибитора МАО селегилина, препятствующего разрушению моноамина, скорость прироста флуоресценции в группе №2 оказалась выше. На основании полученных данных можно сделать вывод, что адреналин вызывает кальциевый сигнал в астроцитах, который зависит от действия МАО.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15-2019-1877.