

2 Арзыкулов, Ж.А. Инновации в лечении аритмии сердца / Ж.А. Арзыкулов, А.А. Омаров, Б.Б. Китуев // Вестник хирургии Казахстана. – 2012. – №4. – С. 67-75.

3 Алпатов, А.В. Методы повышения достоверности диагностических параметров электрокардиосигнала / А.В. Алпатов [и др.] // Биотехносфера. – 2012. – №5-6 (23-24). – С. 84-91.

4 Школьников, М.А. Сердечные аритмии у лиц пожилого возраста и их ассоциация с характеристиками здоровья и смертности / М.А. Школьников, Ю.В. Шубик, В.М. Шальнова [и др.] // Вестник аритмологии. – 2007. – №49. – С. 5-13.

5 Баевский, Р.М. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем: Методические рекомендации / Р.М. Баевский [и др.] // Вестник аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65-87.

6 Баевский, Р.М. Variability сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения / Р.М. Баевский, Г.Г. Иванов // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2001. – №3. – С. 108-127.

7 Рангайян, Р.М. Анализ биомедицинских сигналов. Практический подход / Пер. с англ. – Под ред. А. П. Немирко. – М.: ФИЗМАТЛИТ. – 2010. – 440 с.

8 Physionet. – Режим доступа: <https://physionet.org/>.

Сведения об авторах:

Шульдешов Павел Сергеевич, магистрант второго курса направления 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», группа 81БС-м.

Бондарева Людмила Александровна, канд. техн. наук, доцент кафедры приборостроения, метрологии и сертификации ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева».

Представляемая организация:

Институт приборостроения, автоматизации и информационных технологий ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева»; 302020, г. Орёл, Наугорское шоссе, 29.

УДК 543.42

ОПРЕДЕЛЕНИЕ NADH И FAD МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА

П.М. Горлин, студент; А.А. Палалов, студент; А.Г. Алексеев, к.м.н., доцент
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орёл
e-mail: gorlin23@yandex.ru

В статье представлены результаты экспериментальных исследований возможности оценки метаболической активности различных отделов мозга по результатам измерений эндогенной флуоресценции в острых срезах мозга (NADH).

Нейродегенеративные заболевания – гетерогенная группа разрушительных и неизлечимых заболеваний, распространенных в пожилом возрасте и прогрессирующих в деменцию. Так, по данным Всемирной Организации

Здравоохранения (ВОЗ), в мире насчитывается 50 млн. человек с деменцией, и каждый год выявляется 10 млн. новых случаев. Наиболее часто встречающимися нейродегенеративными заболеваниями являются болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), поражающие 5% (БА) и 1% (БП) людей в возрасте 65 лет и старше [1, 2]. Ежегодные расходы на уход в домах престарелых при основных нейродегенеративных заболеваниях в европейских странах оцениваются в сотни миллионов евро [3].

Нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь мотонейронов, хорею Хантингтона, имеют множество общих патогенетических механизмов – накопление аномально агрегированных белков, нейровоспаление, дисфункция митохондрий, окислительный стресс, гибель нейронов [4,5]. Однако полная картина этиопатогенеза нейродегенерации все еще не установлена. Существует ряд гипотез, объясняющих те или иные проявления нейродегенеративных заболеваний. Одна из них предполагает ключевую роль нарушения работы митохондрий и окислительного стресса в развитии нейродегенерации [6].

Митохондрии – клеточные органеллы, основная функция которых заключается в синтезе АТФ, регуляции кальциевого гомеостаза, жизненного цикла клетки, а также продукции активных форм кислорода (АФК) [7]. АФК – высокоактивные молекулы, которые в норме выполняют сигнальную функцию (например, являются медиаторами клеточного выживания), однако избыточная их продукция приводит к окислительному стрессу, свободному перекисному окислению липидов (СПОЛ) и гибели клетки [8, 9]. Высокий уровень продукции АФК и окислительный стресс характерны для большинства нейродегенеративных заболеваний, что может быть связано с нарушением работы митохондрий и/или дефектом антиоксидантных систем [10]. Оценить работу митохондрий возможно путем определения уровней NADH и FADH₂, доноров протонов водорода для цепи переноса электронов (ЦПЭ). Их оценка *in vitro* может быть осуществлена с помощью флуоресцентной спектроскопии (ФС) – неинвазивного метода, основанного на регистрации эндогенных флуорофоров. Измерение уровня флуоресценции NADH и FAD в клетке позволит сделать вывод о ее метаболической активности.

Цель данной работы – измерение эндогенной флуоресценции в острых срезах мозга (NADH) для оценки метаболической активности различных отделов мозга.

Клеточное дыхание генерирует митохондриальный мембранный потенциал путем накачки протонов митохондриальными комплексами I, III и IV цепи переноса электронов. Митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) используется в качестве протонной движущей силы для синтеза АТФ, помогает поддерживать форму этой органеллы и сохраняет митохондриальные проапоптотические белки, которые выделяются в цитозоль в случае его разрушения. Цианид-анионы крайне токсичны для митохондрий (наиболее токсичным цианидом является синильная кислота (HCN)) и являются ингибиторами фермента цитохром с-оксидазы (aa₃) в IV комплексе ЦПЭ. Они соединяются с железом, которое входит в состав фермента, и тем самым препятствуют переносу электронов между цитохром с-оксидазой и O₂. В результате этого нарушается транспорт электронов и, как следствие, прекращается аэробный синтез АТФ.

Для исследования оценки метаболической активности митохондрий нейронов были выбраны следующие области головного мозга: кора больших полушарий, средний мозг, мозжечок, гиппокамп. Из каждой области было взято по 3-4 среза,

которые были помещены в бюксы с раствором Хенкса на водяной бане, после чего срез мозга помещали на стекло с выемкой и добавляли 200 мкл среды Хенкса.

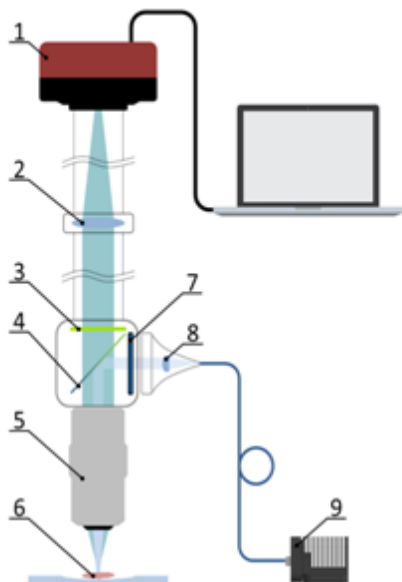


Рис.1 Установка ортогональной микроскопии на основе для исследования клеток на срезе мозга
 1 – ПЗС-камера 340M-USB (Thorlabs etc, США);
 2 – линза LB1945-A f=200 мм (Thorlabs etc, США);
 3 – светофильтр MF455-45 (Thorlabs etc, США);
 4 – дихроичный фильтр MD416 (Thorlabs etc, США);
 5 – планарный апохроматический объектив Mitutoyo M Plan APO 5X (Thorlabs etc, США);
 6 – образец;
 7 – в некоторых экспериментах на этом месте стояла линза LA1805-A f=30 (Thorlabs etc, США) либо LA1708-A f=200 мм (Thorlabs etc, США), в некоторых экспериментах линза отсутствовала;
 8 – коллиматор Thorlabs CVH100-COL (Thorlabs etc, США) с линзой LB1945-A; 9 M365FP1 (Thorlabs etc, США).

Был использован сток-раствор FCCP с концентрацией 10 ммоль/л, затем в пробирке типа Эппендорф смешивали 10 мкл сток-раствора FCCP и 990 мкл среды Хенкса, а также сток-раствор NaCN с концентрацией 100 ммоль/л. Срез помещали в поле зрения установки ортогональной микроскопии на основе капилляроскопа для исследования клеток на срезе мозга (рисунок 1), настраивали фокус, проводили запись базового уровня эндогенной флуоресценции тканей мозга в течение 3 минут. В лунку вносили рабочий раствор FCCP (от 2 до 10 мкл). В течение 3 минут проводили запись уровня эндогенной флуоресценции при подавлении работы комплекса I дыхательной цепи. Затем в лунку вносили сток-раствор NaCN (от 2 до 10 мкл). В течение 3 минут проводили запись уровня эндогенной флуоресценции при подавлении работы комплекса IV дыхательной цепи. Подобные манипуляции повторяли с каждым срезом, а после обрабатывали полученную информацию. После добавления FCCP наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции NADH, а затем ее повышение при добавлении цианид-аниона, что показывает изменение концентрации NADH и FADH: при ингибировании I комплекса – концентрации NADH и FADH₂ увеличиваются. Следствием ингибирования комплексов ЦПЭ является изменение митохондриального потенциала, повышенная продукция АФК и, в конечном счете, гибель клетки.

По результатам экспериментальных исследований построены кинетические кривые изменения флуоресценции срезов мозга, которые показаны на рисунке 2.

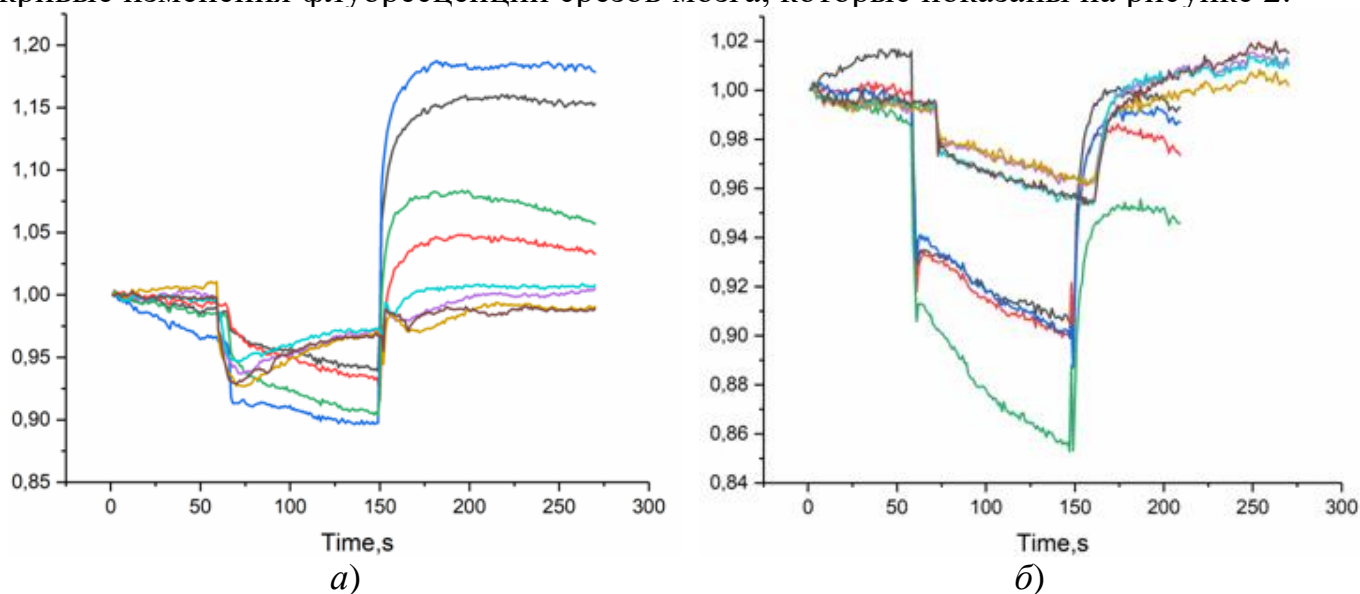


Рис. 2. Примеры кинетических кривых изменения флуоресценции срезов в опытах по сравнительной оценке флуоресценции NADH в срезах мозга из области гиппокампа (а) и мозжечка (б)

Из-за структурных и функциональных отличий различных областей головного мозга, ткани гиппокампа, мозжечка, среднего мозга и коры больших полушарий различаются активностями ферментов общего энергетического обмена, уровнями метаболических реакций. Примечательна иерархическая избирательность клеточной гибели: от гипоксии и повышенного образования АФК быстрее погибают клетки поля CA₁ «pyramidal cells» (нейроны гиппокампа) и нейроны коры больших полушарий III и V слоев, тогда как грушевидные нейроны мозжечка «pear-shaped cells» и нервные клетки среднего мозга сохраняют активность несколько дольше, что отражается повышенной интенсивностью флуоресценции в первом случае и сниженными показателями во втором [11].

Полученные данные показали возможность оценки метаболической активности нервной ткани методом ФС, а также позволили выявить неодинаковую устойчивость к гипоксии и оксидативному стрессу различных областей головного мозга.

Работа выполнена в рамках проекта «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний» на основании подписанного соглашения № 075-15-2019-1877 от 03.12.2019 г.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Masters C.L. et al. Alzheimer's disease // Nat. Rev. Dis. Prim. Macmillan Publishers Limited, 2015. Vol. 1. P. 1-18.
- 2 Poewe W. et al. Parkinson disease // Nat. Rev. Dis. Prim. 2017. Vol. 3. P. 1-21.
- 3 Vossius C. et al. Parkinson's disease and nursing home placement: The economic impact of the need for care // Eur. J. Neurol. 2009. Vol. 16, № 2. P. 194-200.
- 4 Erkinen M.G., Kim M., Geschwind M.D. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases // CHS Perspectives Biol. 2018.
- 5 Yeh F.L., Hansen D. V., Sheng M. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases // Trends Mol. Med. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 23, № 6. P. 512-533.
- 6 Niedzielska E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases // Mol. Neurobiol. 2016. Vol. 53, № 6. P. 4094-4125.
- 7 Angelova P.R., Abramov A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration // FEBS Lett. 2018. Vol. 592, № 5. P. 692-702.
- 8 Zewen Liu, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. P. 1-11.
- 9 Angelova P.R., Abramov A.Y. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology // Free Radic. Biol. Med. Elsevier, 2016. Vol. 100. P. 81-85.
- 10 Wilkins H.M., et al. Mitochondria-derived damage-associated molecular patterns in neurodegeneration // Front. Immunol. 2017. Vol. 8, № APR. P. 1-12.
- 11 Дамианов И. Секреты патологии: Учебное пособие. – М., 2006 – 861 с.

Сведения об авторах:

Горлин Павел Михайлович, студент II курса группы 86 Лечебного факультета Медицинского института, стажер-исследователь лаборатории клеточной физиологии и патологии.

Палалов Александр Александрович, студент IV курса группы 67 Лечебного факультета Медицинского института, стажер-исследователь лаборатории клеточной физиологии и патологии.

Алексеев Александр Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой анатомии, оперативной хирургии и медицины катастроф, декан Лечебного факультета Медицинского института, старший научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии и патологии.

Представляемая организация:

Медицинский институт ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева»; 302028, г. Орёл, ул. Октябрьская, 25.