

УДК 539.183

А.В.Беляков (5 курс, каф. ФЭ), Д.Г.Семенов, д.б.н., в.н.с. ИФ РАН им. И.П.Павлова

ПРИЖИЗНЕННО-ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА Ca^{2+} В СРЕЗАХ МОЗГА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

ABSTRACT: Report is devoted to study of actual problem of modern neurobiology – increasing of neuron tolerance to hypoxia. Pharmacological blockade of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1) as one of brain neuroprotection clinical methods is considered at present work. Modernization necessity of fluorometric investigation is analyzed.

Нервные клетки мозга млекопитающих обладают высокой уязвимостью в условиях кислородного голодания (гипоксии, ишемии). В последние два десятилетия интенсивно исследуются молекулярно-клеточные механизмы повреждения и гибели нейронов во время или вследствие гипоксического воздействия. Ключевая роль в инициации этих механизмов отводится кальций-опосредованным системам сигнальной трансдукции. Результатом гиперактивации глутаматных рецепторов и избыточного высвобождения из пресинапсов возбуждающих аминокислотных медиаторов является избыточное проникновение в клетки ионов Ca^{2+} , вызывающее каскад деструктивных внутриклеточных реакций.

В ряду экспериментальных и клинических способов нейропротекции мозга важное место занимают две стратегии предотвращения клеточной патологии, вызываемой гипоксией. Прежде всего, это фармакологическая блокада (антагонизм) ионотропных глутаматных рецепторов. Другой перспективный способ заключается в немедикаментозном превентивном воздействии на мозг, в частности, путем гипоксического прекодиционирования, кратковременного раздражения, приводящего к мобилизации «естественных» адаптивных клеточных механизмов. Малоизученной областью этой проблемы является участие metabotropic глутаматных рецепторов (mGluR's), активация которых способствует повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} не за счет его проникновения в клетку извне, а за счет его высвобождения из внутриклеточных пулов.

Модуляция активности глутаматергической системы сигнальной трансдукции основана на обмене Ca^{2+} между двумя его внутриклеточными пулами - ионизированным кальцием (Ca-free) и кальцием, связанным с гидрофобными внутриклеточными доменами (белками и липидами) (Ca-bound). В связи с этим, два основных подхода к изучению кальциевой динамики в различных экспериментальных условиях: измерение концентрации Ca-free, базирующееся на использовании соответствующих флуоресцентных маркеров Fura, Quin, Fluo и флуоресцентный мониторинг содержания Ca-bound использующий маркер хлортетрацилин. Последний метод не является традиционным, но удачно используется в нашей лаборатории.

Объектом исследований, являются тангенциальные срезы обонятельной коры мозга крыс линии Вистар, инкубируемые в проточном термостабилизированном солевом буферном растворе. Измерение проводится в модернизированной четырехсрезовой камере, оснащенной системой позиционирования, посредством контактного люминесцентного микроскопа ЛЮАМ-КФ. Сигналы от фотометрической установки преобразуются двухканальным АЦП, обрабатываются программным методом, и выводятся в виде графика временной зависимости на экран монитора.

В число плановых исследовательских тем лаборатории в 2004 году входило изучение роли metabotropic глутаматных рецепторов I группы в развитии патологического

феномена кальциевой перегрузки, вызываемого в переживающих срезах ольфакторной коры мозга крыс 10-минутной аноксией *in vitro*.

Известно, что mGluR1 весьма распространены в коре мозга и могут располагаться как на постсинаптической мембране, так и на пресинаптических терминалах нервных волокон. Существуют две подгруппы этих рецепторов: «1» и «5», имеющие различную пресинаптическую локализацию. В качестве дифференциальных антагонистов для 1 и 5 подгруппы были применены препараты LY367385 и МРЕР, соответственно (оба в концентрации 25 мкМ).

В ходе серии экспериментов было установлено, что блокада как 1, так и 5 подгруппы ImGluR приводит к отчетливому нейропротективному эффекту, что свидетельствует об участии обеих подгрупп в процессах глутаматной нейротоксичности, индуцируемых гипоксией. Показано также, что МРЕР обладает несколько большей нейропротекторной эффективностью при используемых концентрациях, чем LY367385, что позволяет предположить большую роль аноксической активации ImGluR(5) в развитии постаноксической патологии по сравнению с ImGluR(1).

Полученные результаты могут быть положены в основу дальнейших скрининговых нейрофармакологических исследований, но необходима предварительная модернизация измерительного метода. Целесообразно объединение используемого интегрального флуориметрического зондирования и дифференциальной системы видеорегистрации для улучшения разрешения измерения и расширения представления о пространственно-временных параметрах кальциевых сигналов в различных экспериментальных ситуациях, в том числе для определения вклада тех или иных рецепторов в патологические реакции нервных клеток в ответ на гипоксическое воздействие.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. СПб. 1999. 272 с.
2. Самойлов М.О., Мокрушин А.А., Семенов Д.Г. и др. Вовлечение глутаматных рецепторов (NMDA типа) в реакции корковых нейронов на аноксию различной длительности. Вестник РАМН 2000. 9: 34-39.