

властивість охолоджуватись нерівномірно, а за певним законом температурного розподілу. Таким чином, теоретично, ми можемо визначити область на серцевому м'язі, яка є відображенням середнього загального стану охолодження, і критичну область контроль температури, за якою повинен вестись окремо. Це дасть нам змогу відмовитись від використання дорого обладнання без втрати якості отриманих результатів. Такий комплексний підхід до дистанційного контролю температури, дає змогу контролювати рівномірність температурного захисту, визначити рівень охолодження в різних температурних зонах, значно підвищити безпеку контрольованого припинення кровообігу в життєво важливих органах.

Молодова А.Д.

студентка,

*Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»*

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПОСРЕДСТВОМ ФОТОАКТИВАЦИИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТРАНСЛОКАЦИЕЙ КАЛЬЦИЙ – СВЯЗАННОГО ГИППОКАЛЬЦИНА

На сегодняшний день установлен факт участия ионов кальция во многих аспектах метаболизма нервной клетки, начиная от пролиферации, и заканчивая апоптозом [1]. У млекопитающего экспрессируется множество нейрональных кальциевых сенсоров, изменяющих свою конформацию в связке с ионом кальция. Одним из таких сенсоров является гиппокальцин – белок, имеющий 4 кальций связующие EF-мотива, а также миристиновую группу, обеспечивающую встраивание в мембрану в присутствии кальция [2; 4], где он способен запускать разнообразные каскады реакций. Он также демонстрирует способность встраиваться в аппарат Гольджи, пусть и в меньшей степени.

Объект исследования: Объект исследования- двухнедельная культура нейронов гиппокампа, полученная от новорожденной крысы линии Вистар, выращенная на покровном стекле в инкубаторе стерильного бокса отдела Общей физиологии нервной системы института Физиологии им. Богомольца, Киев.

Предмет исследования – процесс высвобождения ионов кальция из молекул кальциевого хелатора (NP-EGTA), с последующим связыванием их с гиппокальцином и встраиванием в мембрану нейрона и аппарат Гольджи.

Цель исследования – получить процент транслокации ионов кальция из цитозоля клетки в мембрану и аппарат Гольджи, посредством измерения интенсивности флуоресценции кальциевого индикатора fluo-4.

Ход эксперимента:

Двухнедельная культура нейронов гиппокампа подвергается плазмидной трансфекции гиппокальцином. Трансфекторным агентом является

липофектамин – 3000, Thermo Fisher Scientific. После трансфекции культура ставится обратно в инкубатор на 2 дня. По истечению этих дней, покровное стекло перемещают в чашку Петри и двукратно отмывают раствором MEM (Minimum Essential Media) minus. Затем готовится S – раствор, посредством растворения 18 мкг глюкозы в 10 мл дистиллята. В 0,5 мл S – раствора с помощью механического сеплера вводят по 0,5 мкл кальциевого хелатера NP-EGTA и кальциевого флуоресцентного индикатора fluo-4. NP-EGTA является высокоселективным к кальцию (K_d (Ca^{2+}) порядка наномолей), и обладает свойством снижать сродство к кальцию в 12500 раз при облучении ультрафиолетом. Fluo-4 является флуоресцентным красителем, изменяющим интенсивность флуоресценции в зависимости от концентрации свободного кальция [5]. Покровное стекло загружается в перфузионную камеру и заливается этим раствором, а также еще 1 мл S – раствора сверх того. Камера устанавливается над объективом инвертирующего флуоресцентного микроскопа. Чувствительная микрокамера ведет покадровую запись фильма. Из культуры выбираются несколько наиболее презентабельных клеток, кот. сперва облучаются ультрафиолетом (380 нм), в это время NP-EGTA отдает ионы кальция в цитозоль, где они захватываются гиппокальцином-fluo-4 и танслоцируются в мембрану и аппарат Гольджи. На мембране, в цитозоле, на аппарате Гольджи установлены ROI- region of interests, с которых средствами среды Offline Analyzer Live Acquisition снимается кинетика уровня флуоресценции fluo-4, выраженного в относительных единицах. В рамках нашего эксперимента, будем считать зависимость уровня флуоресценции зависящим от концентрации кальция линейно.

Из всех значений интенсивности была вычтена флуоресценция base-line (ROI вне клетки), все значения нормированы на интенсивность при $t=0$.

Полученные результаты:

- Устойчивый кальциевый транзистент можно наблюдать начиная с восьмой секунды – сразу после облучения
- Уровень танслокации из цитозоля нейрона находится в пределах от 5% до 25%
- Уровень танслокации в мембрану и аппарат Гольджи доходит до 20% и 13,5% соответственно.
- Уровень танслокации в аппарат Гольджи никогда не был менее 30% от уровня танслокации в мембрану

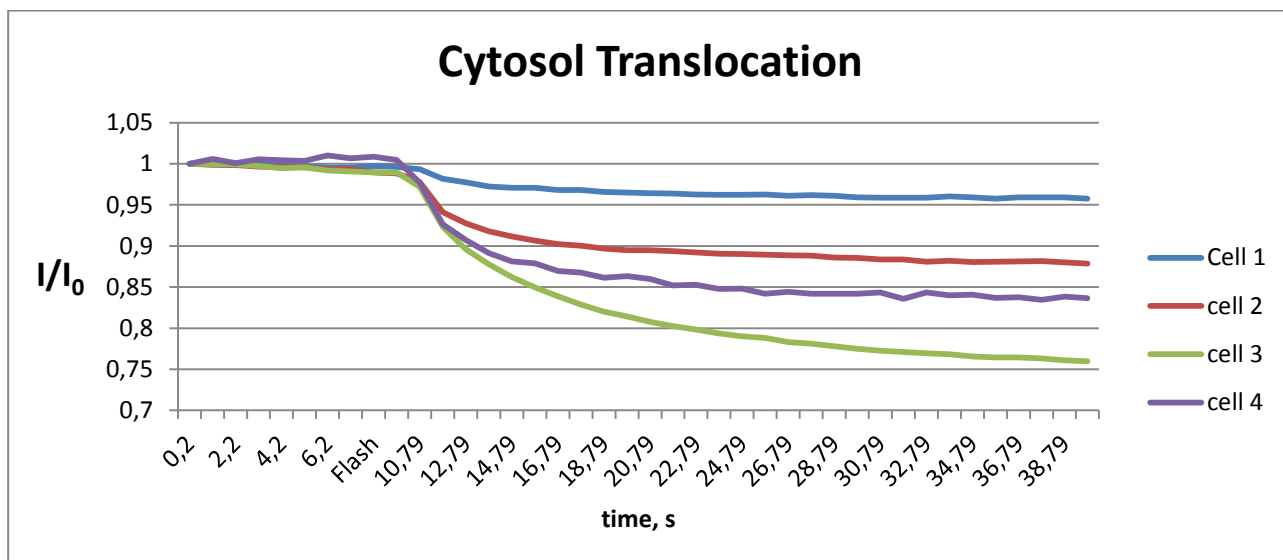


Рис. 1. Транслокація іонів кальція из цитозоля клетки после облучения

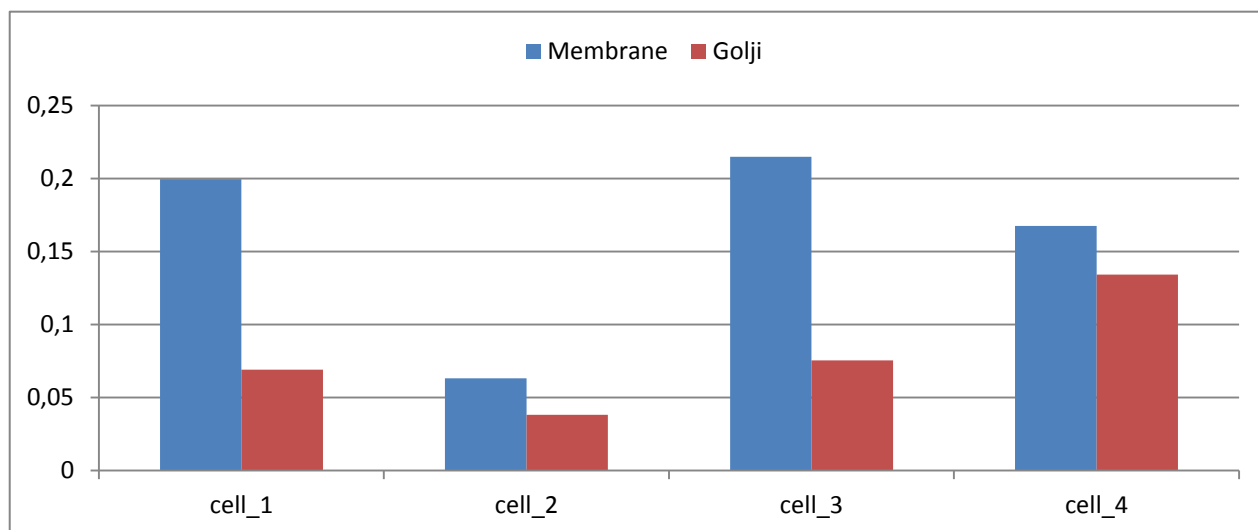


Рис. 2. Приращения относительной интенсивности флуоресценции в мембранах (левые столбцы) и в аппарате Гольджи (правые столбцы)

Список использованных источников:

1. «Molecular fluorescence. Principles and application» – B. Valeur – 2001, Wiley-VCH. – 381 p.
2. «Hippocalcin Functions as a Calcium Sensor in Hippocampal LTD» – Claire L. Palmer, Wonil Lim, Peter G. R. Hastie, Marie Toward, Viktor I. Korolchuk, Stephen A. Burbidge, George Banting, Graham L. Collingridge, John. T. R. Isaac, and Jeremy M. Henley – Neuron. 2005, Aug 18.
3. Hammond C. «Cellular and Molecular Neurophysiology», Elsevier – 2008.
4. Костюк П. Г., Зима В. Л. «Биофизика»: Киев – 2001.
5. Berridge M. J. «Neuronal calcium signaling». Neuron 21 (1998).