

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №3

2020



УДК 577.15:[611.82+611.81]:599.323.4

03.03.01 Физиология

DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.2

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-СИНТАЗЫ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫСЫ

© Узлова Е.В., Зиматкин С.М.

*Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230009, ул. Гродно, Горького, 80**Резюме***Цель.** Выяснить региональное и клеточное распределение АТФ-синтазы в мозге крысы.**Методика.** Для исследования использован материал от 5 беспородных крыс-самцов массой 220-250 г. Проводилась быстрая декапитация, извлекались головной и спинной мозг крыс, его кусочки заключали в парафин, готовили серийные срезы, которые использовались для идентификации структур (окраска по методу Ниссля) и последующего иммуногистохимического выявления АТФ-синтазы.**Результаты.** АТФ-синтаза обнаруживается в цитоплазме нейронов и отсутствует в ядре. Она выявляется в нейронах всех отделов мозга, но её содержание значительно варьирует в зависимости от функции нейронов.**Заключение.** Для АТФ-синтазы характерно неравномерное региональное и клеточное распределение. Количество АТФ-синтазы может варьировать в пределах отдельно взятых структур. Оно не зависит от филогенетического возраста структур, но зависит от функциональной нагрузки.*Ключевые слова:* АТФ-синтаза, головной мозг, спинной мозг, иммуногистохимия, крысы

DISTRIBUTION OF ATP SYNTHASE IN RAT BRAIN STRUCTURES

Uzlova E.V., Zimatkin S.M.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus**Abstract***Objective.** To find out regional and cell distribution of ATP synthase in the rat brain.**Methods.** For the study material from 5 outbred male rats weighing 200 grams was used. Quick decapitation was performed, the brain and spinal cord were extracted. After tissue processing serial sections were made, one of them was used for structures identification (Nissl staining) and following immunohistochemical staining for ATP synthase.**Results.** ATP synthase is found in neurons throughout the cytoplasm, apart for the nucleus. Immunostaining is present in all brain parts and structures but its intensity varies significantly. Myelin sheath of nerve fibers do not stain.**Conclusion.** ATP synthase is characterized by uneven regional and cellular distribution. The amount of ATP synthase varies within individual structures. It is independent of phylogenetic age, but dependent of functional activity.*Keywords:* ATP synthase, brain, spinal cord, immunohistochemistry, rats**Введение**

Митохондриальная АТФ-синтаза – белок, представляющий собой «молекулярную машину», снабженную уникальным роторным механизмом. АТФ-синтаза использует энергию, созданную протонным электрохимическим градиентом, для фосфорилирования АДФ в АТФ и отличается чрезвычайно высоким коэффициентом полезного действия – близким к 100% [7]. Кроме того, АТФ-синтаза участвует и в формировании структуры крист. Осуществляется это за счет существования АТФ-синтазы в виде димеров, которые соединяются в т.н. ряды [6].

Вопрос регионального и клеточного распределения АТФ-синтазы в мозге представляет интерес в связи с тем, что данный фермент является одним из маркеров энергетической активности митохондрий [1]. Примечательно, что подавляющая часть имеющихся сведений о распределении АТФ-синтазы не освещает вопросы ее регионального распределения в норме и не носит систематизированный характер. Таким образом, изучение распределения АТФ-синтазы в структурах мозга крысы позволит оценить их энергетический потенциал.

Цель исследования – выяснить региональное и клеточное распределение АТФ-синтазы в мозге крысы.

Методика

Для исследования был использован материал от 5 беспородных белых крыс-самцов массой 220-250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария на полноценном рационе. Соблюдались все требования Директивы Европейского Парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол №2 от 15.01.2020). Проводилась стандартная быстрая декапитация крыс в утренние часы, извлекали головной мозг и шейный отдел спинного мозга. Головной мозг делили на 3 части фронтальными разрезами. Фиксация проводилась в комбинированном фиксаторе – цинк-этанол-формальдегиде при +4°C в течение 20 ч., затем образцы обезвоживали в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Образцы шейного отдела спинного мозга обрабатывались таким же образом. Серийные срезы толщиной 5 мкм изготавливали через каждые 500 мкм с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на заранее подготовленные стекла. Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [9], другой – окрашивали иммуногистохимически для выявления содержания АТФ-синтазы. Применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в оптимальном разведении 1:2400, экспозиция 20 ч, при +4°C во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Изучение препаратов, микрофотографирование и цитофотометрию в структурах мозга проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США; серийный номер 31415926535897). В описательной статистике определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку использовали критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test), для сравнения нескольких независимых групп по одному признаку – критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H-test).

Результаты исследования и их обсуждение

Иммуноокрашивание АТФ-синтазы с различной интенсивностью было выявлено в цитоплазме нейронов и нейропиле всех отделов мозга. Ядра нейронов, при этом, остаются неокрашенными. Это соответствует принятым представлениям о расположении митохондрий в цитоплазме тел нейронов и их отростков. Эти данные не противоречат имеющимся результатам исследований распределения митохондрий в нейронах, указывающих на существование митохондрий в виде подвижных сетей [10].

В структурах обонятельного мозга количество АТФ-синтазы варьирует. В обонятельной луковице отмечается низкая интенсивность иммуноокрашивания; исключение составляют крупные митральные клетки (рис. 1-А), отвечающие за передачу информации к обонятельным центрам высшего порядка [3]. В трехслойной пириформной коре наибольшую интенсивность окрашивания следует отметить во II слое (рис. 1-Б) – пирамидном, нейроны которого крупные и достаточно плотно расположены. В гиппокампе интенсивное окрашивание характерно для пирамидного слоя СА1-СА3 полей (рис. 1-В, Г). Однако, окрашивание в пределах пирамидного слоя неоднородное:

большая интенсивность отмечается в клетках-канделябрах. Хорошо выражено иммуноокрашивание в нейронах зернистого слоя зубчатой извилины.

Неоднородное окрашивание в пирамидном слое гиппокампа может быть связано с участием в синхронизации разрядов локальных сетей других типов клеток пирамидного слоя [8], а достаточно высокое содержание фермента в пирамидном слое СА2 поля может быть обусловлено его исключительной ролью в процессах памяти и нормальном социальном поведении [5]. Высокое содержание АТФ-синтазы в нейронах пирамидного слоя СА3 поля может быть связано с энергозависимой функцией его нейронов – они связывают потоки информации древних структур ствола мозга и ассоциативных областей коры [4]. Таким образом, СА3 поле значительно отличается от других полей гиппокампа не только функционально и по строению, но и по энергетическому потенциалу.

В структурах неокортекса – например, во фронтальной коре – минимально выраженное окрашивание наблюдается в I слое. Во II-VI слоях коры иммуноокрашивание выраженное, но количество АТФ-синтазы варьирует (рис. 1-Д, Е).

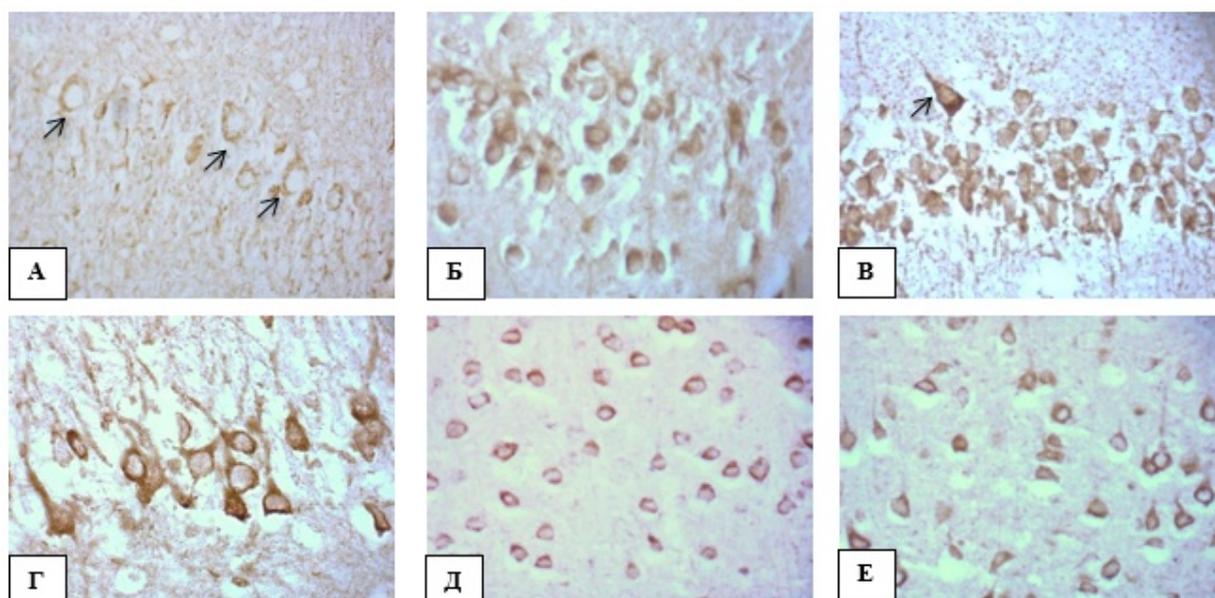


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу в структурах конечного мозга крысы: А – митральные клетки обонятельной луковицы, Б – II слой пириформной коры, В – пирамидный слой СА1, Г – пирамидный слой СА3, Д – III слой фронтальной коры, Е – V слой фронтальной коры. Ув. $\times 400$. Цифровая микрофотография

Нейроны II и III слоев содержат ассоциативные нейроны, отвечают за внутрикорковые связи; филогенетически эти слои более молодые. На нейронах IV слоя оканчиваются проекционные волокна от ядер таламуса. Количество АТФ-синтазы в этих слоях ниже, чем в нейронах V и VI слоев. От пирамидных нейронов V слоя начинаются эфферентные проекционные волокна, а от нейронов VI слоя – ассоциативные и комиссуральные волокна [2]. Таким образом, распределение АТФ-синтазы в слоях шестислойной коры может быть детерминировано их функциональными особенностями, требующими разное количество энергии.

Эпендимоциты, выстилающие желудочки мозга и покрывающие сосудистые сплетения, характеризуются достаточно интенсивным иммуноокрашиванием (рис. 2-А). Значительное иммуноокрашивание обнаружено в ядрах таламуса, среди которых паравентрикулярное (рис. 2-Б), медиальное габенулярное (рис. 2-В) и латеральное габенулярное (рис. 2-Г) ядра. В нейронах гипоталамуса также отмечается достаточно сильное иммуноокрашивание (рис. 2-Д,Е). Следует отметить, что и в структурах таламуса, и в структурах гипоталамуса степень окрашивания нейронов значительно варьирует.

Следует отметить, что количество АТФ-синтазы в клетках Пуркинье коры мозжечка значительно не отличается от таковой в ядрах ствола.

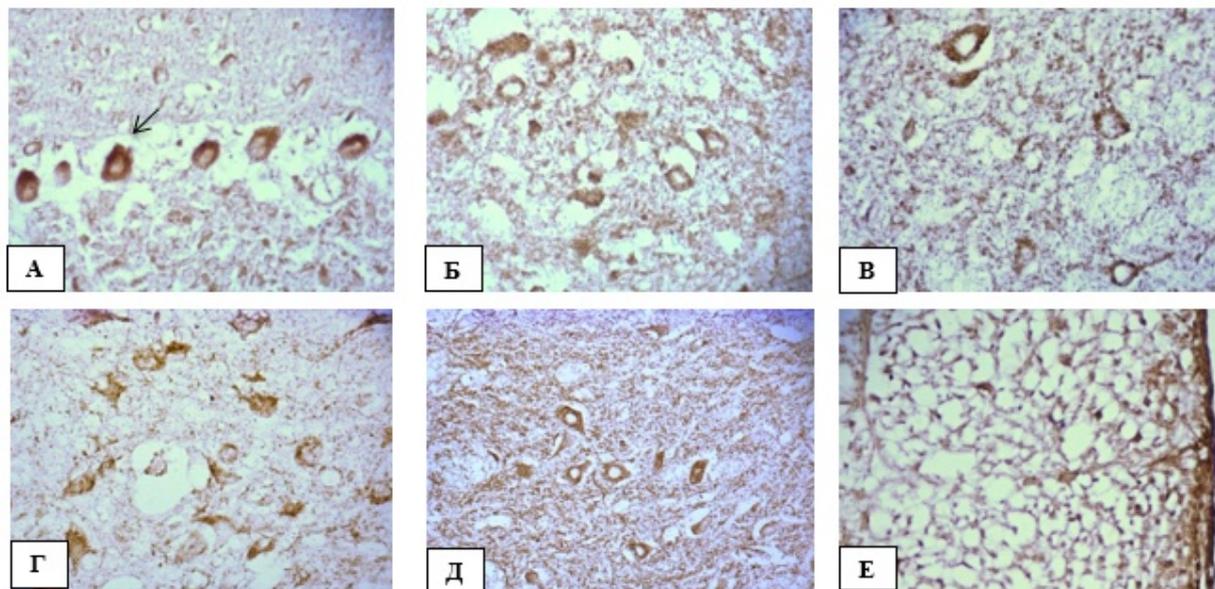


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу в эпендимоцитах III желудочка, ядрах таламуса и гипоталамуса: А – эпендимоциты III желудочка, Б – паравентрикулярное ядро таламуса, В – медиальное габенулярное ядро таламуса, Г – латеральное габенулярное ядро таламуса, Д – гистаминергические нейроны E1 гипоталамуса, Е – гистаминергические нейроны E4 гипоталамуса Ув. $\times 400$. Цифровая микрофотография

В трехслойной коре мозжечка наибольшее содержание АТФ-синтазы наблюдается в клетках Пуркинье (рис. 3-А). Высокое содержание АТФ-синтазы имеют структуры ствола – как нейроны ядер, так и осевые цилиндры проводящих путей (рис. 3-Б-Е).

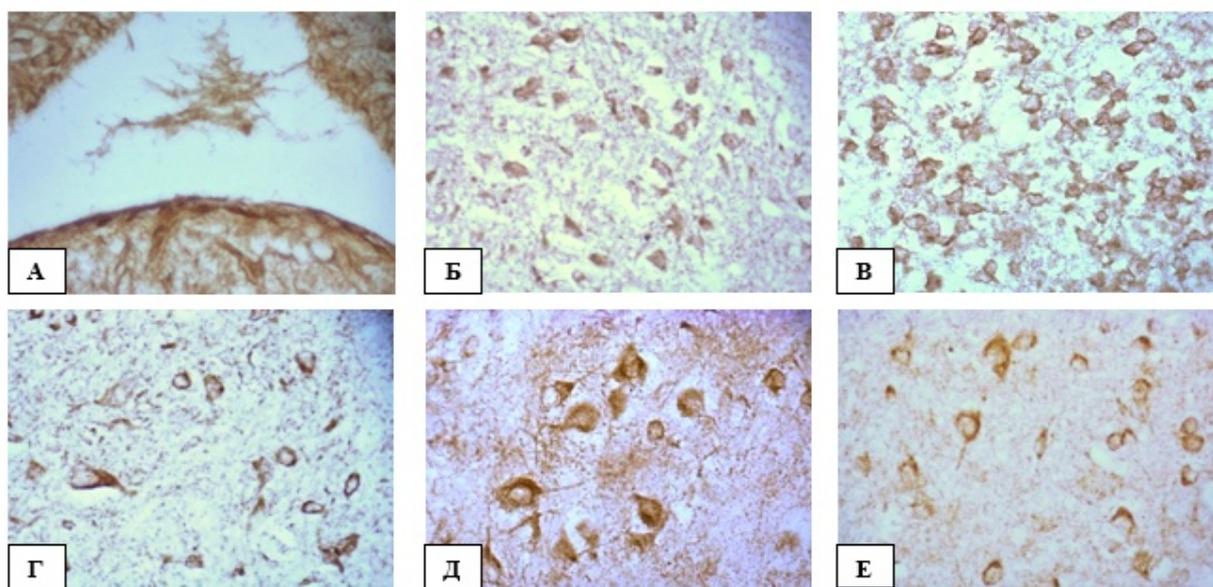


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу в коре мозжечка и стволе мозга: А – клетки Пуркинье коры мозжечка, Б – ядро подъязычного нерва, В – ядро Голля, Г – ядро глазодвигательного нерва, Д – ядро лицевого нерва, Е – тракт тройничного нерва. Ув. $\times 400$. Цифровая микрофотография

В сером веществе шейного отдела спинного мозга интенсивно иммуноокрашены мотонейроны передних рогов (рис. 4-А). Вставочные нейроны задних рогов окрашены менее интенсивно. В

целом, содержание АТФ-синтазы в слоях серого вещества по Рекседу различается. В белом веществе, представленном пучками Голя (тонкий пучок) и Бурдаха (клиновидный пучок), боковыми и передними канатиками (рис. 4-Б) на поперечных срезах окрашиваются отростки нейронов (осевые цилиндры), а миелиновая оболочка вокруг них остается неокрашенной. Достаточно высокое содержание АТФ-синтазы обнаружено и в эпендимоцитах центрального канала спинного мозга. Достаточно высокое содержание АТФ-синтазы обнаружено и в эпендимоцитах центрального канала спинного мозга.

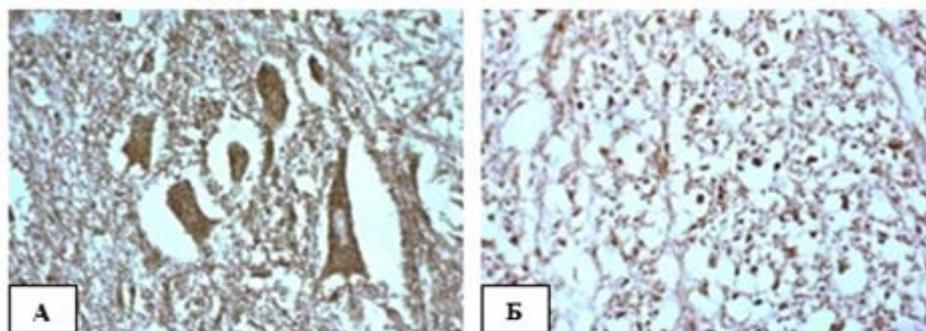


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу в шейном отделе спинного мозга: А – мотонейроны передних рогов, Б – передний канатик. Ув. $\times 400$. Цифровая микрофотография

Неоднородность распределения АТФ-синтазы в структурах головного и спинного мозга крысы подтверждается и результатами измерения оптической плотности иммуноокрашивания в перикарионах нейронов (табл.).

Таблица. Содержание АТФ-синтазы в структурах мозга крысы (в ед. опт. пл. $\times 10^3$)

Отдел	Структуры	Me \pm IQR	
Конечный мозг	Митральные клетки обонятельной луковицы	163,3 \pm 107,3	
	II слой пириформной коры		199,3 \pm 65,4
	Гиппокамп	Пирамидный слой CA1	255,8 \pm 49,2
		Пирамидный слой CA2	314,8 \pm 137,5
		Пирамидный слой CA3	344,4 \pm 110,0
	Зернистый слой зубчатой извилины		309,3 \pm 148,1
	Фронтальная кора	II слой	245,1 \pm 96,0
		III слой	248,1 \pm 66,9
		IV слой	245,0 \pm 77,6
		V слой	334,2 \pm 105,2
VI слой		287,0 \pm 88,6	
Мозжечок	Клетки Пуркинье мозжечка	209,6 \pm 41,6	
Ствол мозга	Нейроны ядра подъязычного нерва	172,0 \pm 50,0	
Спинной мозг	Мотонейроны спинного мозга	393,0 \pm 85,4	

При этом наибольшее содержание АТФ-синтазы обнаружено в крупных, ганглиозных нейронах: пирамидных нейронах гиппокампа, внутреннем пирамидном слое неокортекса и мотонейронах спинного мозга. Следовательно, именно эти нейроны имеют хорошо развитый энергетический аппарат (энергетический потенциал), необходимый для выполнения ими своих функций.

Выводы

1. АТФ-синтаза локализована в цитоплазме нейронов и в эпендимоцитов и характеризуется гетерогенным распределением в структурах головного и спинного мозга крысы. Среди структур обонятельного мозга наибольшее содержание АТФ-синтазы характерно для нейронов пирамидного слоя CA2-CA3 полей гиппокампа и зернистого слоя зубчатой извилины. При этом, в пределах пирамидного слоя интенсивность окрашивания варьирует.

2. Содержание АТФ-синтазы в филогенетически более старых V и VI слоях неокортекса выше, чем в филогенетически более молодых II-IV слоях. В спинном мозге содержание фермента наиболее высокое в крупных мотонейронах передних рогов, в белом веществе АТФ-синтаза содержится только в отростках нейронов (осевых цилиндрах), но не в миелиновой оболочке. Количество фермента в ядрах ствола ниже, чем в мотонейронах спинного мозга.

Литература (references)

1. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – Т.7, №1. – С. 47-52. [Bon' E.I., Maksimovich N.E. Rol' mitohondrij v jenergetike kletki i harakterizujushhie ee molekularnye markery // Orenburgskij medicinskij vestnik. – 2019. – V.7, N.1. – P. 47-52. (in Russian)]
2. Гайворонский И.В., Гайворонский А.И., Ничипорук Г.И. Функциональная анатомия нервной системы: учебное пособие. 8-е изд., перераб. и доп. / Санкт-Петербург: СпецЛит, 2016. – 353 с. [Gajvoronskij I.V., Gajvoronskij A.I., Nichiporuk G.I. Funkcional'naja anatomija nervnoj sistemy: uchebnoe posobie. 8-e izd., pererab. i dop. / Sankt-Peterburg:SpecLit, 2016. – 353 p.]
3. Зильбернагль С., Деспопулос А. Наглядная физиология. 2-е изд., переработанное и дополненное (пер. с англ.) / Под ред. Т.И. Почкаева, Т.Е. Толстихина. – М.:Лаборатория знаний, 2019. – 424 с. [Zil'bernagl' S., Despopulos A. Nagljadnaja fiziologija. 2-e izd., pererabotannoe i dopolnennoe (per. s angl.) / Pod red. T.I. Pochkaeva, T.E. Tolstihina. – M.: Laboratorija znanij, 2019. – 424 p.]
4. Aggleton J.P., O'Mara S.M., Vann S.D. et al. Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions // The European Journal of Neuroscience. – 2010. – V.31, N12. – P. 2292-2307.
5. Dudek S.M., Alexander G.M., Farris S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions // Nature review. Neuroscience. – 2016. – V.17, N2. – P. 89-102.
6. Hahn A., Parey K., Bublitz M. et al. Structure of a complete ATP synthase dimer reveals the molecular basis of inner mitochondrial membrane morphology // Molecular Cell. – 2016. – V.63, N3. – P. 445-456.
7. Kinosita K. Jr., Yasuda R., Noji H. F1-ATPase: a highly efficient rotary ATP machine // Essays in Biochemistry. – 2000. – V.35 – P. 3-18.
8. Klausberger T., Magill P.J., Marton L.F. et al. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo // Nature. – 2003. – V.421, N6925. – P. 844-888.
9. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. – London: Academic Press, 2007. – 448 p.
10. Yaffe M. Dynamic mitochondria // Nature Cell Biology. – 1999. – V.1, N6. – P. 149-150.

Информация об авторах

Узлова Елизавета Валентиновна – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: uzlovaliza@gmail.com

Зиматкин Сергей Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: smzimatkin@mail.ru