Клеточная биология и физиология

Cell biology and physiology

УДК 577.15:611.81.018.82:599.323.4

АТФ-СИНТАЗА В НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ

Е. В. УЗЛОВА[1)]***, С. М. ЗИМАТКИН***[1)]

[1)]*Гродненский государственный медицинский университет, ул. М. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Беларусь*

Выявлены закономерности и особенности регионального распределения АТФ-синтазы в нейронах структур мозга крысы, проведена количественная оценка ее содержания на клеточном уровне. Исследование выполнено на материале от 5 беспородных белых крыс-самцов. Парафиновые срезы были подвергнуты окрашиванию по Нисслю для идентификации структур головного мозга и шейного отдела спинного мозга, а также иммуногистохимическому окрашиванию на АТФ-синтазу. Цитофотометрически изучены 102 структуры мозга крысы. Иммунореактивность АТФ-синтазы, отличающаяся высокой гетерогенностью, обнаружена во всех исследованных структурах, при этом для большинства из них характерно умеренное содержание АТФ-синтазы. Высокий уровень данного фермента выявлен в крупных нейронах и в нейронах структур филогенетически более старых отделов мозга. Установлено, что содержание АТФ-синтазы также зависит от слоя коры и положения нейронов в рефлекторной дуге, в спинном мозге определяется не только размером нейронов, но и слоем серого вещества.

Ключевые слова: АТФ-синтаза; нейроны; иммуногистохимия; мозг; крыса.

Образец цитирования:
Узлова ЕВ, Зиматкин СМ. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;3:17–27.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-17-27

For citation:
Uzlova EV, Zimatkin SM. ATP synthase in rat brain neurons. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;3: 17–27. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-17-27

Авторы:
Елизавета Валентиновна Узлова – аспирантка кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии педиатрического факультета. Научный руководитель – С. М. Зиматкин.
Сергей Михайлович Зиматкин – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии педиатрического факультета.

Authors:
Elizaveta V. Uzlova, postgraduate student at the department of histology, cytology and embryology, faculty of pediatrics.
uzlovaliza@gmail.com
Siarhei M. Zimatkin, doctor of science (biology), full professor; head of the department of histology, cytology and embryology, faculty of pediatrics.
zimatkin@grsmu.by

CC BY NC

ATP SYNTHASE IN RAT BRAIN NEURONS

***E. V. UZLOVA*[a], *S. M. ZIMATKIN*[a]**

[a]*Grodno State Medical University, 80 M. Horkaha Street, Hrodna 230009, Belarus*
Corresponding author: E. V. Uzlova (uzlovaliza@gmail.com)

Mitochondrial ATP synthase is the main enzyme of ATP synthesis. A large number of diseases, including neurodegenerative ones, are associated with disorders of its assembly and functioning. The aim of the work is to reveal the patterns and features of the regional distribution of ATP synthase in the neurons of the rat brain structures, with a quantitative assessment of its content at the cellular level. The study was carried out on material from 5 outbred white male rats. Paraffin sections were stained by the Nissl method to identify structures of the brain and cervical segments of the spinal cord, and for ATP synthase by immunohistochemical method; 102 structures of the rat brain were studied cytophotometrically. Immunoreactivity of ATP synthase was found in all structures of the rat brain with high heterogeneity, while most structures are characterised with a moderate content of ATP synthase. A high content of ATP synthase was found in large neurons and in neurons of structures of phylogenetically older brain divisions. The content of ATP synthase also depends on the layer of the cortex and the position of neurons in the reflex arc. In the spinal cord the content of ATP synthase depends not only on the size of neurons, but also on the gray matter layer.

Keywords: ATP synthase; neurons; immunohistochemistry; brain; rat.

Введение

Процесс синтеза АТФ – универсального источника энергии в живых организмах – является результатом работы комплексов электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и АТФ-синтазы митохондрий. АТФ-синтаза, располагающаяся на внутренней мембране, использует созданный комплексами ЭТЦ протонный градиент для фосфорилирования АДФ в АТФ [1]. Наряду с энергоснабжением она участвует в формировании крист внутренней мембраны митохондрий [2], а также может осуществлять гидролиз АТФ и перекачивать протоны через внутреннюю мембрану при сбое нормального течения дыхания [3]. С нарушениями сборки и (или) функционирования АТФ-синтазы ассоциировано множество заболеваний, в том числе нейродегенеративных [4–10].

Нервная ткань требует большого количества энергии [8; 11] и, как следствие, наиболее зависит от работы митохондрий, а АТФ-синтаза является основным компонентом в процессе синтеза АТФ. Поскольку мозг сложно организован, логично предположить и гетерогенность распределения АТФ-синтазы. Имеющаяся в литературе информация затрагивает малую часть структур и исключительно патологические состояния, чего определенно недостаточно для оценки содержания АТФ-синтазы в структурах мозга крысы [12], т. е. их энергетического потенциала.

Цель настоящего исследования – выявить закономерности и особенности регионального распределения АТФ-синтазы в нейронах мозга крысы и провести количественную оценку ее содержания на клеточном уровне.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся материал от 5 беспородных белых крыс-самцов массой 220–250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария на полноценном рационе с соблюдением всех требований Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза № 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, использующихся для научных целей». На проведение исследования получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 15 января 2020 г.).

Выполняли быструю декапитацию крыс в утренние часы, извлекали головной мозг и шейный отдел спинного мозга. Головной мозг делили на три части фронтальными разрезами. Проводили фиксацию в цинк-этанол-формальдегиде [13] при +4 °С в течение 20 ч, затем образцы обезвоживали в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм изготавливали через каждые 500 мкм с использованием микротома Leica 2125 RTS (*Leica Biosystems*, Германия) и монтировали на заранее подготовленные стекла.

Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [14], другой – иммуногистохимически для выявления содержания АТФ-синтазы. Применяли первичные моноклональные мышиные антитела Anti-ATP5A antibody (ab14748) (*Abcam*, Великобритания)

в оптимальном разведении 1 : 2400 (экспозиция – 20 ч при +4 °С во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab80436) (*Abcam*).

Положительным контролем выступали ткани с известным высоким содержанием АТФ-синтазы, отрицательным – срезы, которые вместо первичных антител обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Дополнительным внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки и ядра нейронов (иммунопозитивная окраска в них должна была отсутствовать).

Изучение препаратов, микрофотографирование и цитофотометрию в структурах мозга проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (*Zeiss*, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC320 (*Leica Microsystems*, Германия) и программы компьютерного анализа изображения *ImageWarp* (*Bit Flow*, США). Всего изучено 102 структуры мозга. В них у каждого животного измеряли иммунореактивность (содержание) АТФ-синтазы в цитоплазме 20–30 нейронов, которую выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) или условных единицах (усл. ед.).

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы *Statistica 10.0* для *Windows* (серийный номер 31415926535897) (*StatSoft Inc.*, США). Результаты цитофотометрии представляли в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана; LQ – верхняя граница нижнего квартиля; UQ – нижняя граница верхнего квартиля.

Результаты и их обсуждение

Иммунореактивность АТФ-синтазы разной интенсивности обнаружена в нейронах всех структур мозга крысы. При этом в цитоплазме нейронов отчетливо наблюдаются скопления окрашенных продуктов иммуногистохимической реакции в виде гранул, соответствующие представлениям о расположении митохондрий в цитоплазме тел нейронов и их отростках. В ядрах нейронов АТФ-синтаза не выявляется.

Региональное и клеточное распределение АТФ-синтазы в мозге крысы характеризуется высокой гетерогенностью: нейроны разных типов и отделов мозга содержат неодинаковое количество данного фермента, что отражает разный энергетический потенциал этих нейронов (табл. 1). Так, содержание АТФ-синтазы варьирует от 159–172 усл. ед. в нейронах медиального ядра миндалины, митральных клетках обонятельной луковицы и нейронах ядра подъязычного нерва до 519–545 усл. ед. в вестибулокохлеарном ганглии и центральном шейном ядре спинного мозга крысы (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание АТФ-синтазы в нейронах структур мозга крысы, $\times 10^3$ ед. опт. пл.

Table 1

ATP synthase content in neurons of rat brain structures, $\times 10^3$ optical units

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Me (LQ; UQ))
Конечный мозг	
Митральные клетки обонятельной луковицы	163,3 (117,7; 225,0)
Латеральная передняя обонятельная кора (слой II)	287,4 (266,6; 318,2)
Пириформная кора (слой II)	313,2 (274,4; 364,8)
Гиппокамп (слой II): поле CA1 поле CA2 поле CA3	 255,8 (223,0; 272,2) 314,8 (247,8; 385,3) 344,4 (280,3; 390,3)
Зубчатая извилина (слой II)	309,3 (226,6; 374,7)
Пресубикулум: слой II слой III слой IV слой V слой VI	 323,2 (293,3; 367,2) 324,2 (291,6; 344,3) 334,0 (240,1; 427,0) 344,0 (312,7; 380,3) 341,0 (300,8; 394,3)

Продолжение табл. 1
Continuation table 1

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Me (LQ; UQ))
Париетальная кора:	
слой II	209,3 (170,5; 234,4)
слой III	238,5 (196,2; 293,7)
слой V	295,5 (267,7; 336,2)
слой VI	297,4 (256,0; 309,2)
Поясная (цингулярная) кора:	
слой II	255,4 (200,7; 317,1)
слой III	297,2 (255,3; 350,1)
слой V	373,3 (348,0; 419,6)
слой VI	344,2 (311,0; 392,4)
Фронтальная кора:	
слой II	245,2 (193,4; 289,3)
слой III	248,1 (209,4; 276,2)
слой IV	245,0 (213,0; 290,6)
слой V	331,1 (255,8; 373,9)
слой VI	287,0 (246,5; 335,1)
Височная кора:	
слой II	267,0 (204,4; 317,4)
слой III	309,2 (269,5; 330,0)
слой IV	310,3 (262,1; 365,6)
слой V	339,5 (286,5; 380,1)
слой VI	360,4 (262,1; 411,6)
Затылочная (зрительная) кора:	
слой II	249,6 (208,1; 339,1)
слой III	295,0 (269,5; 323,3)
слой IV	299,4 (258,5; 358,0)
слой V	363,2 (301,1; 411,0)
слой VI	326,3 (277,1; 413,7)
Ретросплениальная агранулярная кора:	
слой II	275,5 (264,4; 312,8)
слой III	333,2 (274,1; 389,7)
слой V	295,5 (257,0; 340,6)
слой VI	300,2 (255,6; 352,8)
Моторная кора:	
слой II	199,5 (166,3; 208,5)
слой III	179,7 (165,1; 241,6)
слой V	200,4 (184,3; 220,2)
слой VI	200,0 (192,2; 245,5)
Медиальное ядро миндалины	158,7 (151,0; 176,4)
Базолатеральное ядро миндалины	176,1 (155,2; 248,4)
Базомедиальное ядро миндалины	193,0 (175,9; 226,4)
Латеральное ядро миндалины	216,9 (190,4; 258,6)
Скорлупа	271,8 (241,9; 302,0)
Промежуточный мозг	
Таламус	
Интермедиодорсальное ядро	249,9 (227,3; 278,6)
Ядра задней группы	255,9 (216,9; 294,2)
Вентральное постеролатеральное ядро	278,9 (256,5; 334,8)
Вентральное постеромедиальное ядро	285,9 (250,3; 324,9)
Латеродорсальное вентролатеральное ядро	307,9 (250,3; 376,9)

Продолжение табл. 1
Continuation table 1

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Me (LQ; UQ))
Латеральное постеральное ядро	320,5 (286,0; 373,5)
Паравентрикулярное ядро	321,8 (272,2; 371,4)
Медиальное габенулярное ядро	334,4 (313,7; 359,1)
Центральное медиальное ядро	348,8 (316,1; 401,0)
Гипоталамус	
Латеральная гипоталамическая область	199,8 (163,7; 237,7)
Дорсомедиальное ядро	250,6 (221,4; 323,8)
Вентролатеральное вентромедиальное ядро	289,3 (265,1; 310,4)
Дорсомедиальное вентромедиальное ядро	291,9 (215,7; 350,9)
Супрамаммилярное ядро	380,4 (349,9; 432,9)
Медианное маммилярное (сосцевидное) ядро	384,2 (351,9; 411,9)
Дугообразное ядро	387,8 (357,3; 414,7)
Гистаминергическое ядро E2	433,3 (411,5; 476,1)
Средний мозг	
Верхняя область покрышки	282,9 (242,2; 311,0)
Дорсальное ядро шва	300,6 (239,2; 377,7)
Интерпедункулярное ядро	345,3 (274,5; 435,7)
Красное ядро	352,8 (312,6; 391,5)
Компактное вещество черной субстанции	371,4 (324,7; 402,7)
Мезенцефалическое ядро тройничного нерва	379,5 (328,7; 423,1)
Ретикулярное вещество черной субстанции	413,0 (370,7; 444,7)
Мост и продолговатый мозг	
Ядро подъязычного нерва	172,0 (157,5; 207,2)
Препозитарное подъязычное ядро	291,5 (264,9; 330,5)
Медиальное вестибулярное ядро	298,1 (274,0; 391,9)
Адреналинергическая группа нейронов C1	324,6 (300,2; 382,6)
Большое ядро шва	328,9 (285,9; 373,1)
Вентральное медуллярное ретикулярное ядро	337,6 (290,1; 389,3)
Ядро нижней оливы	348,9 (301,5; 360,0)
Ретроветролатеральное ретикулярное ядро	349,0 (327,1; 424,3)
Ядро Бурдаха	361,2 (315,5; 391,9)
Ядро лицевого нерва	362,1 (320,3; 388,2)
Гигантоцеллюлярное ядро	364,6 (318,1; 458,0)
Спинальное ядро тройничного нерва	368,2 (323,1; 414,5)
Ядро Голля (ядро тонкого пучка)	369,8 (350,0; 397,8)
Латеральное ретикулярное ядро	395,2 (368,5; 463,9)
Ядро пучка Пробста	398,5 (373,5; 437,4)
Дорсальное медуллярное ретикулярное поле	409,7 (389,3; 420,2)
Дорсальное моторное ядро блуждающего нерва	422,6 (356,6; 460,1)
Медианное добавочное ядро	449,2 (417,3; 486,8)
Вестибулококлеарный ганглий	518,9 (444,6; 571,6)

Окончание табл. 1
Ending table 1

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Me (LQ; UQ))
Мозжечок	
Парамедианная долька (клетки Пуркинье)	255,7 (211,7; 289,9)
Простая долька (клетки Пуркинье)	262,3 (229,2; 283,5)
Околоклочок (клетки Пуркинье)	344,5 (304,1; 393,7)
Пирамида (клетки Пуркинье)	364,2 (333,5; 389,6)
Медиальное ядро	312,8 (283,1; 356,5)
Вставочное ядро	349,6 (319,8; 402,4)
Латеральное ядро	365,5 (329,0; 416,6)
Дорсолатеральное медиальное ядро	388,7 (345,5; 412,5)
Спинной мозг (шейный отдел)	
Вставочные нейроны задних рогов	456,0 (419,9; 498,1)
Мотонейроны передних рогов: добавочное ядро центральное шейное ядро	 491,6 (474,4; 516,8) 545,4 (536,3; 561,5)

Все исследованные структуры были разделены на четыре группы в зависимости от интенсивности иммуноокрашивания (низкая – 150–250 усл. ед., умеренная – 250–350 усл. ед., высокая – 350–450 усл. ед. и очень высокая – 450–550 усл. ед.) (см. табл. 1). К первой группе (15,6 % от общего количества структур) относятся преимущественно структуры конечного мозга. Вторая группа – самая многочисленная (56,9 %), в нее входят структуры из различных отделов головного мозга, преобладающего отдела нет. К третьей группе (22,6 %) относятся структуры ствола, а также нейроны слоев V и VI неокортекса. Четвертая группа – самая малочисленная (4,9 %), в нее входят нейроны шейного отдела спинного мозга, а также медианное добавочное ядро продолговатого мозга и вестибулокохлеарный ганглий. Таким образом, для большинства структур мозга характерен умеренный уровень иммуноокрашивания в пределах от 250 до 350 усл. ед.

Для нейронов конечного мозга отмечена наибольшая гетерогенность содержания АТФ-синтазы: обнаружены нейроны как с низкой, так и с умеренной и высокой интенсивностью окрашивания (рис. 1). Эта гетерогенность, вероятно, обусловлена большим количеством и функциональным разнообразием структур конечного мозга. Не была обнаружена связь между интенсивностью иммуноокрашивания в конечном мозге и филогенетическим возрастом. Для структур нео-, палео- и архикортекса характерны различные уровни содержания АТФ-синтазы (см. табл. 1). В целом более высокие уровни АТФ-синтазы в пределах конечного мозга выявлены в крупных нейронах (пирамидных и клетках-канделябрах).

Крайне низким содержанием АТФ-синтазы характеризуются митральные клетки обонятельной луковицы и нейроны ядер миндалины, в то время как боковое обонятельное ядро и нейроны слоя II зубчатой извилины содержат умеренные количества АТФ-синтазы (см. рис. 1; табл. 1). Относительно слабое развитие энергетического аппарата в митральных клетках обонятельной луковицы можно объяснить уникальным типом их работы – ритмической активностью (при вдыхании пахучих веществ) [15], что, возможно, приводит к меньшей скорости расхода энергии и, как следствие, менее развитому энергетическому аппарату, чем у большинства других нейронов.

Достаточно высокое содержание АТФ-синтазы обнаруживается в крупных (ганглиозных) нейронах, таких как нейроны слоя II гиппокампа (особенно поля CA3), нейронах внутреннего пирамидного слоя неокортекса, нейронах ядер мозжечка, нейронах ядер продолговатого мозга и мотонейронах спинного мозга (рис. 2–4). Следовательно, размеры нейронов оказывают влияние на степень развития энергетического аппарата.

Если рассматривать интенсивность иммуноокрашивания отдельно в многослойных структурах конечного мозга, можно заметить, что она зависит от функций, выполняемых нейронами в пределах конкретного слоя (см. табл. 1). Нейроны слоев II и III, отвечающие за внутрикорковые связи (их аксоны образуют ассоциативные волокна), характеризуются менее развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны слоев V и VI (образуют комиссуральные и проекционные волокна).

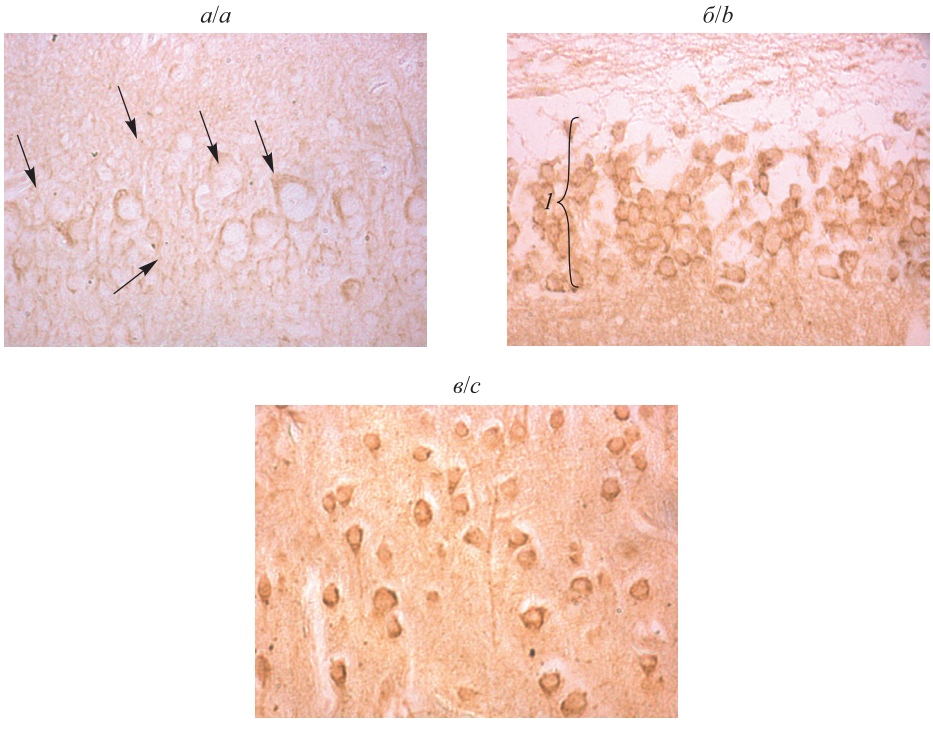


Рис. 1. Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу (увеличение ×400):
а – митральные клетки обонятельной луковицы (низкая интенсивность иммуноокрашивания);
б – нейроны слоя II зубчатой извилины (умеренная интенсивность) (*1*);
в – нейроны слоя III париетальной коры (высокая интенсивность)

Fig. 1. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×400):
a – mitral cells of the olfactory bulb (low intensity of immunostaining);
b – neurons of the layer II of the dentate gyrus (moderate intensity) (*1*);
c – neurons of the layer III of the parietal cortex (high intensity)

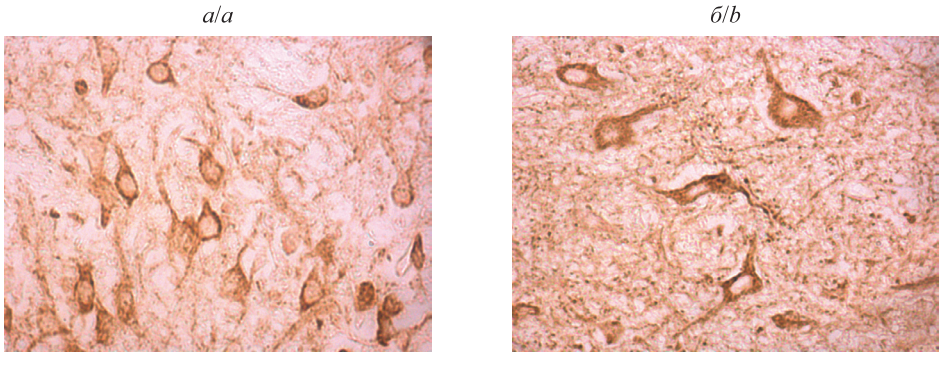


Рис. 2. Иммуногистохимическая окраска на АТФ-синтазу (увеличение ×400):
а – нейроны слоя II гиппокампа (поле CA3); *б* – медиальное ядро мозжечка

Fig. 2. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×400):
a – neurons of the layer II of the hippocampus (field CA3);
b – medial nucleus of the cerebellum

Отдельного внимания заслуживает гетерогенное распределение АТФ-синтазы в нейронах слоя II гиппокампа и зубчатой извилины. Прежде всего это связано с размером клеток: нейроны поля CA1, эквивалентного мелкоклеточной области, имеют менее развитый энергетический аппарат, чем нейроны полей CA2 и CA3 крупноклеточной области. Также немалый вклад вносит характер функций нейронов полей: нейроны поля CA3 крупноклеточной области соединяют потоки информации древних структур ствола мозга и ассоциативных областей коры и отличаются несколько более развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны поля CA2. Исключением являются нейроны зернистого слоя зубчатой извилины, которые, несмотря на некрупные размеры, по уровню развития энергетического аппарата близки к нейронам полей CA2 и CA3. Вполне вероятно, это связано с продолжением их дифференцировки во взрослых организмах [16].

Нельзя не отметить тенденцию к повышенному содержанию АТФ-синтазы в нейронах структур филогенетически более старых отделов – промежуточного мозга, среднего мозга, моста и продолговатого мозга крысы (см. рис. 3 и 4). Доля структур ствола в группах возрастает по мере увеличения интенсивности иммуноокрашивания (табл. 2). Данная тенденция объясняется прежде всего характером структур, расположенных в стволе: они включают ядра черепных нервов и жизненно важные центры, что предполагает значительную функциональную нагрузку и, вероятно, требует хорошо развитого энергетического аппарата.

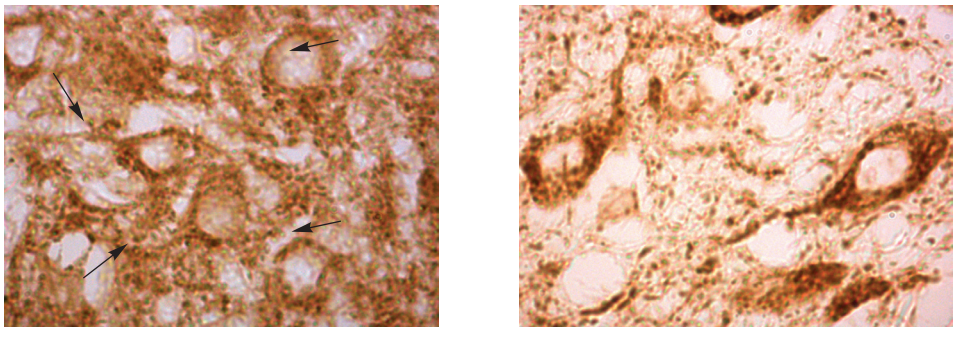


Рис. 3. Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу (увеличение ×1000):
а – нейроны большого ядра шва; *б* – нейроны ядра одиночного пути

Fig. 3. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×1000):
a – neurons of the nucleus raphe magnus; *b* – neurons of the solitary tract nucleus

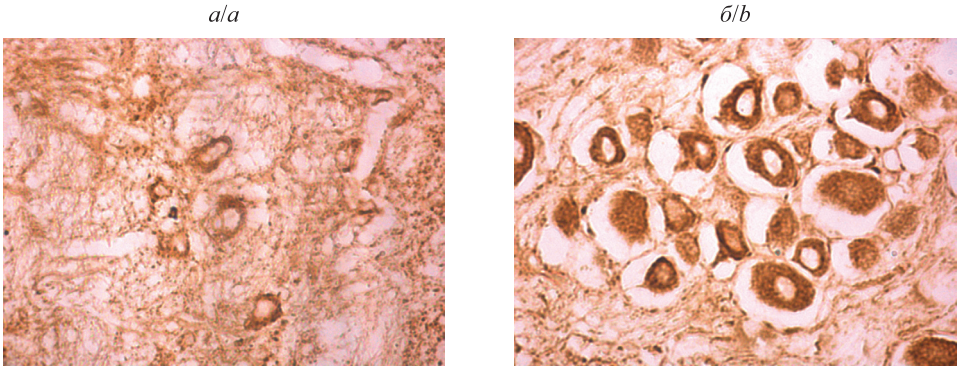


Рис. 4. Иммуногистохимическая окраска на АТФ-синтазу (увеличение ×400):
а – нейроны мезенцефалического ядра тройничного нерва; *б* – вестибулокохлеарный ганглий

Fig. 4. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×400):
a – neurons of the mesencephalic nucleus of trigeminal nerve; *b* – vestibulocochlear ganglion

Лишь небольшая часть исследованных структур головного и спинного мозга крысы содержат рецепторные и эффекторные нейроны. Данные структуры характеризуются высоким и очень высоким уровнем АТФ-синтазы. Из этого следует, что в некоторой степени выраженность энергетического аппарата нейронов определяется их функциональным типом и расположением в рефлекторных дугах, причем рецепторные нейроны вестибулокохлеарного ганглия содержат больше АТФ-синтазы, чем рецепторные нейроны мезенцефалического ядра тройничного нерва, располагающегося в среднем мозге (см. рис. 4; табл. 2). Мезенцефалическое ядро состоит в основном из типичных для ганглиев черепных нервов псевдоуниполярных нейронов [17] и имеет только электрические синапсы [18], а вестибулокохлеарный ганглий содержит преимущественно биполярные нейроны [19]. Возможно, различие в развитии энергетических аппаратов нейронов данных структур обусловлено разными структурными типами нейронов и (или) превалирующим типом синапсов.

В нейронах мозжечка содержание АТФ-синтазы варьирует от умеренного до высокого уровня. В коре мозжечка оно различается по слоям, достигая наибольшей величины в клетках Пуркинье (рис. 5, *а*). Это можно объяснить значительным количеством синаптических связей, клеток Пуркинье, что, без сомнения, требует существенных энергетических затрат, а также большим размером данных нейронов. При этом ядра мозжечка содержат больше АТФ-синтазы, чем клетки Пуркинье (см. рис. 5).

В нейронах спинного мозга содержание АТФ-синтазы выше, чем в нейронах головного мозга. Но оно варьирует и зависит как от размера нейронов, так и от слоя серого вещества, в котором располагаются эти нейроны (см. табл. 1; рис. 6).

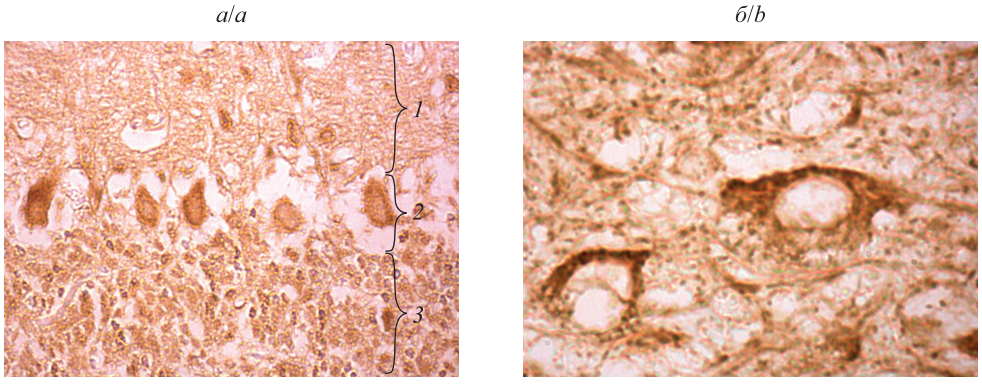


Рис. 5. Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу (увеличение ×400 (*а*) и увеличение ×1000 (*б*)):
а – кора мозжечка, червь (*1* – молекулярный слой, *2* – клетки Пуркинье, *3* – зернистый слой);
б – нейроны вставочного ядра мозжечка

Fig. 5. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×400 (*a*) and magnification ×1000 (*b*)):
a – cerebellar cortex, vermis (*1* – molecular layer, *2* – Purkinje cells, *3* – granular layer);
b – neurons of the interposed cerebellar nucleus

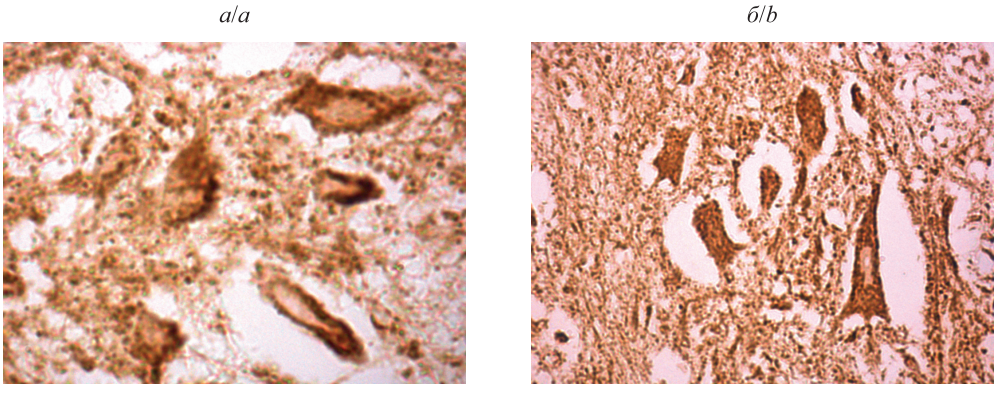


Рис. 6. Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу (увеличение ×1000 (*а*) и увеличение ×400 (*б*)):
а – вставочные нейроны шейного отдела спинного мозга;
б – мотонейроны шейного отдела спинного мозга

Fig. 6. Immunostaining for ATP synthase (magnification ×1000 (*a*) and magnification ×400 (*b*)):
a – interneurons of the cervical area of the spinal cord; *b* – motor neurons of the cervical area of the spinal cord

Таблица 2

Распределение структур отделов мозга крысы по содержанию АТФ-синтазы, %

Table 2

Distribution of rat brain structures by ATP synthase content, %

Интенсивность иммуноокрашивания	Конечный мозг	Промежуточный мозг		Средний мозг	Мост и продолговатый мозг	Мозжечок	Спинной мозг (шейный отдел)
		Таламус	Гипоталамус				
Низкая (150–250 усл. ед.)	75,0	6,25	12,5	0	6,25	0	0
Умеренная (250–350 усл. ед.)	56,9	13,8	3,4	5,2	12,1	8,6	0
Высокая (350–450 усл. ед.)	13,05	0	17,4	17,4	39,1	13,05	0
Очень высокая (450–550 усл. ед.)	0	0	0	0	40,0	0	60,0

Заключение

АТФ-синтаза обнаружена в нейронах всех отделов головного мозга и шейного отдела спинного мозга крысы. Ее распределение в структурах мозга гетерогенно. Большинство нейронов мозга характеризуются умеренным содержанием АТФ-синтазы в цитоплазме. Высокий уровень данного фермента выявлен в рецепторных и эффекторных нейронах ствола мозга, нейронах ядер мозжечка и спинного мозга. Крупные (ганглиозные) нейроны мозга отличаются более высоким содержанием АТФ-синтазы. Связи между нейромедиаторной природой нейронов и содержанием в них АТФ-синтазы не обнаружено.

Учитывая важнейшую роль АТФ-синтазы в энергообеспечении клеток, полученные данные можно использовать для оценки энергетического потенциала нейронов в норме и его изменений при различных экспериментальных воздействиях и патологических состояниях (например, при ишемии мозга). Представляет интерес выяснение взаимосвязей между содержанием АТФ-синтазы и функциональным состоянием нейронов.

Библиографические ссылки

1. Capaldi RA, Aggeler R. Mechanism of the F_1F_o-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences.* 2002;27(3):154–160. DOI: 10.1016/S0968-0004(01)02051-5.

2. Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal.* 2002;21(3):221–230. DOI: 10.1093/emboj/21.3.221.

3. Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, et al. Regulation of mitochondrial structure and function by the F_1F_o-ATPase inhibitor protein, IF_1. *Cell Metabolism.* 2008;8(1):13–25. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.06.001.

4. García JJ, Ogilvie I, Robinson BH, Capaldi RA. Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtDNA. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(15):11075–11081. DOI: 10.1074/jbc.275.15.11075.

5. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, et al. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnestic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease.* 2008;30(1):107–120. DOI: 10.1016/j.nbd.2007.12.007.

6. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, et al. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research.* 2009;1793(1):186–199. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.012.

7. Terni B, Boada J, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. Mitochondrial ATP synthase in the entorhinal cortex is a target of oxidative stress as stages I/II of Alzheimer's disease pathology. *Brain Pathology.* 2010;20(1):222–233. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00266.x.

8. Filosto M, Scarpelli M, Cotelli MS, Vielmi V, Todeschini A, Gregorelli V, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology.* 2011;258(10):1763–1774. DOI: 10.1007/s00415-011-6104-z.

9. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences.* 2012;322(1–2):254–262. DOI: 10.1016/j.jns.2012.05.030.

10. Dautant A, Meier T, Hahn A, Tribouillard-Tanvier D, di Rago J-P, Kucharczyk R. ATP synthase diseases of mitochondrial genetic origin. *Frontiers in Physiology.* 2018;9:329. DOI: 10.3389/fphys.2018.00329.

11. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;777(1):380–387. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb34449.x.

12. Узлова ЕВ, Зиматкин СМ. Распределение АТФ-синтазы в структурах мозга крысы. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2020;19(3):11–16. DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.2.

13. Коржевский ДЭ, Гилерович ЕГ, Кирик ОВ, Григорьев ИП, Сухорукова ЕГ, Алексеева ОС и др. *Иммуногистохимическое исследование головного мозга.* Коржевский ДЭ, редактор. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2016. 143 с.

14. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th edition. Amsterdam: Academic Press; 2007. [448 p.].

15. Yamaguchi K, Ueda K. Rhythmic discharge of mitral cells in the carp olfactory bulb. *Brain Research.* 1984;322(2):378–381. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90138-0.

16. Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 1982;216(4548):890–892. DOI: 10.1126/science.7079742.

17. Mameli O, Caria MA, Biagi F, Zedda M, Farina V. Neurons within the trigeminal mesencephalic nucleus encode for the kinematic parameters of the whisker pad macrovibrissae. *Physiological Reports.* 2017;5(10):e13206. DOI: 10.14814/phy2.13206.

18. Baker R, Llinás R. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *The Journal of Physiology.* 1971; 212(1):45–63. DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009309.

19. Carricondo F, Romero-Gómez B. The cochlear spiral ganglion neurons: the auditory portion of the VIII nerve. *The Anatomical Record.* 2019;302(3):463–471. DOI: 10.1002/ar.23815.

References

1. Capaldi RA, Aggeler R. Mechanism of the F_1F_o-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences.* 2002;27(3):154–160. DOI: 10.1016/S0968-0004(01)02051-5.

2. Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal.* 2002;21(3):221–230. DOI: 10.1093/emboj/21.3.221.

3. Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, et al. Regulation of mitochondrial structure and function by the F_1F_o-ATPase inhibitor protein, IF_1. *Cell Metabolism.* 2008;8(1):13–25. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.06.001.

4. García JJ, Ogilvie I, Robinson BH, Capaldi RA. Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtDNA. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(15):11075–11081. DOI: 10.1074/jbc.275.15.11075.

5. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, et al. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnestic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease.* 2008;30(1):107–120. DOI: 10.1016/j.nbd.2007.12.007.

6. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, et al. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research.* 2009;1793(1):186–199. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.012.

7. Terni B, Boada J, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. Mitochondrial ATP synthase in the entorhinal cortex is a target of oxidative stress as stages I/II of Alzheimer's disease pathology. *Brain Pathology.* 2010;20(1):222–233. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00266.x.

8. Filosto M, Scarpelli M, Cotelli MS, Vielmi V, Todeschini A, Gregorelli V, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology.* 2011;258(10):1763–1774. DOI: 10.1007/s00415-011-6104-z.

9. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences.* 2012;322(1–2):254–262. DOI: 10.1016/j.jns.2012.05.030.

10. Dautant A, Meier T, Hahn A, Tribouillard-Tanvier D, di Rago J-P, Kucharczyk R. ATP synthase diseases of mitochondrial genetic origin. *Frontiers in Physiology.* 2018;9:329. DOI: 10.3389/fphys.2018.00329.

11. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;777(1):380–387. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb34449.x.

12. Uzlova EV, Zimatkin SM. Distribution of ATP synthase in rat brain structures. *Vestnik Smolenskoi gosudarstvennoi meditsinskoi akademii.* 2020;19(3):11–16. Russian. DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.2.

13. Korzhevskii DE, Gilerovich EG, Kirik OV, Grigor'ev IP, Sukhorukova EG, Alekseeva OS, et al. *Immunogistokhimicheskoe issledovanie golovnogo mozga* [Immunohistochemical study of the brain]. Korzhevskii DE, editor. Saint Petersburg: SpetsLit; 2016. 143 p. Russian.

14. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th edition. Amsterdam: Academic Press; 2007. [448 p.].

15. Yamaguchi K, Ueda K. Rhythmic discharge of mitral cells in the carp olfactory bulb. *Brain Research.* 1984;322(2):378–381. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90138-0.

16. Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 1982;216(4548):890–892. DOI: 10.1126/science.7079742.

17. Mameli O, Caria MA, Biagi F, Zedda M, Farina V. Neurons within the trigeminal mesencephalic nucleus encode for the kinematic parameters of the whisker pad macrovibrissae. *Physiological Reports.* 2017;5(10):e13206. DOI: 10.14814/phy2.13206.

18. Baker R, Llinás R. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *The Journal of Physiology.* 1971; 212(1):45–63. DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009309.

19. Carricondo F, Romero-Gómez B. The cochlear spiral ganglion neurons: the auditory portion of the VIII nerve. *The Anatomical Record.* 2019;302(3):463–471. DOI: 10.1002/ar.23815.

Получена 28.05.2021 / исправлена 28.06.2021 / принята 07.07.2021.
Received 28.05.2021 / revised 28.06.2021 / accepted 07.07.2021.