

## **ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ АТФ-СИНТАЗЫ В НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*Узлова Е.В., Зиматкин С.М., Бонь Е.И.*

*Гродненский государственный медицинский университет,  
Беларусь, Гродно*

*Изучение АТФ-синтазы при ишемии головного мозга представляет интерес для расширения представлений о ее влиянии на биоэнергетику головного мозга. Несмотря на преимущественно снижение содержания АТФ-синтазы, результаты исследования демонстрируют различные степень и скорость изменений в пределах отделов и мозга в целом.*

**Ключевые слова:** *АТФ-синтаза; ишемия; крыса; нейроны; мозг.*

## **CHANGE IN ATP SYNTHASE IMMUNOREACTIVITY IN RAT BRAIN NEURONS AFTER SUBTOTAL ISCHEMIA**

*Uzlova E.V., Zimatkin S.M., Bon E.I.*

*Grodno State Medical University,  
Belarus, Grodno*

*The study of ATP synthase during cerebral ischemia is of interest for expanding the understanding of its effect on bioenergetics of the brain. Despite the predominant decrease in the content of ATP synthase, the results demonstrate a varying degrees and rates of changes within the departments and the brain as a whole.*

**Key words:** *ATP synthase; ischemia; rat; neurons; brain.*

**Актуальность.** В связи с высокой метаболической активностью, головной мозг крайне уязвим к нарушениям кровотока, и при его нарушении развивается церебральная ишемия. Поскольку степень повреждения нейронов зависит от продолжительности церебральной ишемии и регионарных особенностей устойчивости к ней, актуальным является вопрос изучения содержания АТФ-синтазы – универсального фермента внутренней мембраны митохондрий, отражающего энергетический потенциал нейронов, в различных типах нейронов и отделах мозга при ишемии для расширения уже имеющихся представлений о влиянии гипоксических/ишемических состояний на биоэнергетику головного мозга.

**Цель.** Выявить закономерности изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах различных отделов мозга крысы при субтотальной ишемии.

**Материалы и методы исследования.** Для исследования использован материал от 12 белых беспородных крыс-самцов массой 220±30 г.

Контрольная и две опытные группы включали по 4 животных каждая. Для моделирования субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) осуществлялась перевязка обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг) на 30 минут и 3 часа. Контрольным животным проводилась ложная операция. После постановки опыта проводилась быстрая декапитация, извлекали головной мозг и разделяли его на три части двумя фронтальными разрезами.

Фиксация проводилась в комбинированном фиксаторе цинк-этанол-формальдегиде. После обезвоживания и просветления изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм через каждые 500 мкм с помощью микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали их на заранее подготовленные стекла. Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля с целью идентификации структур мозга крысы по атласу [1]. Второй срез окрашивали иммуногистохимически на АТФ-синтазу с использованием моноклональных мышинных антител Anti-ATP5A antibody (Abcam, Великобритания, ab14748) в разведении 1:2400.

Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit HRP/DAВ IHC Detection Kit – Micropolymer (Abcam, Великобритания, ab236466). Изучение препаратов, микрофотографирование и цитофотометрию при разных увеличениях микроскопа проводили на микроскопе Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия) с цифровой видеокамерой Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с использованием программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Всего изучено 25 отделов, областей, слоев коры и ядер мозга. Иммунореактивность (ИР) АТФ-синтазы выражали в единицах оптической плотности  $\times 10^3$ .

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Результаты цитофотометрии представляли в виде медианы, верхней границы нижнего квартиля и нижней границы верхнего квартиля. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

**Результаты.** АТФ-синтаза выявлена в цитоплазме тел нейронов и их отростках. Обнаруживаемая при этом зернистость цитоплазмы соответствует общепринятым представлениям о расположении митохондрий в цитоплазме тел нейронов и их отростках. Ядра нейронов остаются неокрашенными. В зависимости от длительности ишемического воздействия в опытных группах появляются нейроны крайне слабо окрашенные и с плохо визуализируемой областью ядра. Кроме того, сильно снижается зернистость цитоплазмы, что может свидетельствовать о деструкции митохондрий [2].

Полученные данные об изменении ИР АТФ-синтазы в структурах разных отделов мозга крысы указывают на тенденцию к снижению ИР. Тем не менее, скорость и степень снижения ИР в отделах сильно различаются. Наиболее быстрое и значительное снижение иммунореактивности АТФ-синтазы обнаружено в неокортексе и периаллокортексе: в них отмечается

резкое снижение ИР АТФ-синтазы на 30%-50% уже после 30-минутной СИГМ. После 3-часовой СИГМ ИР в них не продолжает снижение. В пириформной коре, гиппокампе и зубчатой извилине ИР снижается в меньшей степени и медленнее, чем в неокортексе и периаллокортексе. Также скорость и степень снижения ИР АТФ-синтазы отличается в полях гиппокампа: наиболее уязвимое к ишемическим повреждениям поле СА1 [3] характеризуется плавным снижением ИР, в то время как в относительно устойчивом поле СА3 и зубчатой извилине [3] ИР снижается быстрее. Единственной из исследованных структур, в которой после 30-минутного ишемического воздействия отмечается резкое повышение ИР АТФ-синтазы (на 50%) является слой митральных клеток обонятельной луковицы, но при длительном воздействии ИР возвращается до контрольного уровня. Такое «волнообразное» изменение с повышением ИР примечательно в свете сравнительно низкого содержания АТФ-синтазы в митральных клетках в норме [4].

В нейронах ядер промежуточного мозга скорость и характер изменения ИР сильно различаются, но в целом происходит снижение ИР по мере увеличения длительности ишемического воздействия. Единственным исключением являются нейроны задней группы ядер таламуса, в которых за снижением ИР после 30-минутной СИГМ следует возвращение к контрольному уровню после 3-часовой СИГМ.

В нейронах среднего и продолговатого мозга изменения ИР носят медленный и менее выраженный характер в сравнении с другими отделами, т.к. изменения ИР находятся в пределах  $\pm 10\%$ , а в ряде структур – например, в вентральной области покрышки и в спинальном ядре тройничного нерва – не выявлено статистически значимых изменений ИР.

В структурах мозжечка – как в нейронах ядер, так и в клетках Пуркинье коры – не происходит снижение ИР после 30-минутной СИГМ. После 3-часовой СИГМ ИР снижается в нейронах ядер на 15%-20%. В клетках Пуркинье разных участков коры после 3 часов СИГМ не происходит изменения ИР (проста долька), либо ИР снижается (околокочок), но в меньшей степени, чем в нейронах ядер мозжечка.

**Заключение.** Характер и скорость изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах различных структур мозга крысы при СИГМ отличаются. Наиболее быстрым и значительным снижением содержания АТФ-синтазы характеризуются нейроны конечного, частично промежуточного мозга. В пределах конечного мозга скорость и степень уменьшения содержания АТФ-синтазы варьируют и зависят от филогенетического возраста: в нейронах аллокортекса энергетический потенциал снижается медленнее и в меньшей степени, чем в неокортексе. В нейронах филогенетически наиболее старой части мозга – ствола – содержание АТФ-синтазы снижается медленнее и в меньшей степени. В структурах мозжечка содержание АТФ-синтазы не изменяется после 30-минутной СИГМ, но при более продолжительном

ишемическом воздействии происходит снижение содержания АТФ-синтазы в нейронах ядер и клетках Пуркинье некоторых частей коры мозжечка.

### **Список литературы**

1. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th edition / G. Paxinos, C. Watson. – London: Academic Press, 2007. – 448 p.
2. Кузнецова, В.Б. Особенности ультраструктуры нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга и реперфузии / В.Б. Кузнецова, Е.И. Криштофик, О.О. Козляковская // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1. – С. 44-48.
3. Schmidt-Kastner, R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia / R. Schmidt-Kastner // Neuroscience. – 2015. – Vol. 309. – P. 259-279.
4. Узлова, Е.В. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы / Е.В. Узлова, С.М. Зиматкин // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2021. – № 3. – С. 17-27.