

Д.Э.Коржевский^{1,2}, В.В.Гусельникова¹, И.П.Григорьев¹, О.В.Кирик¹

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БЕЛОК HSP60 В КЛЕТКАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫСЫ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — проф. РАН Д.Э.Коржевский, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАН, Санкт-Петербург; ² кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

HSP60 относится к группе белков теплового шока (HSP) и находится, преимущественно, в митохондриях клеток. В нервной системе дисфункция и недостаточный синтез белка HSP60 приводят к развитию нейродегенерации. Цель настоящей работы состояла в иммуногистохимическом определении локализации белка HSP60 в нейронах и глиоцитах продолговатого мозга крысы. Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г (n=7). Полученные результаты свидетельствуют, что для белка HSP60 характерно дискретное распределение в цитоплазматических структурах нейронов и глиоцитов. В крупных нейронах, благодаря локальной аккумуляции HSP60, можно проследить мелкие структуры, которые, вероятно, являются митохондриями. Важным наблюдением является отсутствие цитозольной реакции в нейронах и глиоцитах продолговатого мозга. Этот факт является основанием для использования реакции на HSP60 в комплексных исследованиях апоптоза нервных клеток, поскольку при нем должно происходить накопление цитозольного HSP60 и смещение иммунопозитивного продукта к плазмолемме.

Ключевые слова: ствол мозга, HSP60, иммуногистохимия

HSP60 относится к группе белков теплового шока и находится, преимущественно, в митохондриях клеток, участвуя, наряду с белком HSP10, в обеспечении правильной организации митохондриальных белков в трехмерные молекулярные структуры [6]. Наряду с этим, белок HSP60 принимает участие в регуляции процессов, связанных с апоптозом [11]. При апоптозе наблюдаются накопление HSP60 в цитозоле [8] и транслокация его к плазмолемме [11].

В нервной системе дисфункция и недостаточный синтез белка HSP60 приводят к развитию нейродегенерации [5]. При различных нейродегенеративных процессах у человека и животных HSP60 был обнаружен в составе амилоидных телец — патологических структур, которым приписывают как нейрональное, так и глиальное происхождение [1, 3]. Несмотря на интерес к белку HSP60, изучение его экспрессии при моделировании патологических процессов на лабораторных животных ограничено. Кроме того, отсутствие достаточных сведений о распределении HSP60 в нейронах интактного мозга не позволяет в пол-

ной мере оценить его внутриклеточную локализацию в экспериментальных условиях.

В связи с этим целью настоящей работы состояла в определении локализации белка HSP60 в нейронах и глиоцитах продолговатого мозга крысы с использованием методов иммуногистохимии.

Материал и методы. Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г (n=7) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Образцы головного мозга фиксировали в смеси цинк-этанол-формальдегида по описанной ранее методике [2], после чего обезжизивали и заливали в парафин стандартным способом. Для выявления белка HSP60 применяли кроличьи поликлональные антитела (Spring Bioscience, США) в разведении 1:200. Перед постановкой реакции проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере pH 6,1 (S1700, Dako, Дания). В качестве вторичных реагентов использовали HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Biosciences, США). Продукт иммуногистохимической реакции визуализировали, используя рабочий раствор 3,3'-диаминобензидина, приготовленный из набора реагентов DAB+ (Dako, Дания). После постановки иммуногистохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла с последующим подсинением в щелочной воде. Анализ полу-

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), Гусельникова Валерия Владимировна (e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru), Григорьев Игорь Павлович (e-mail: ipg-iem@yandex.ru), Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

ченных препаратов и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

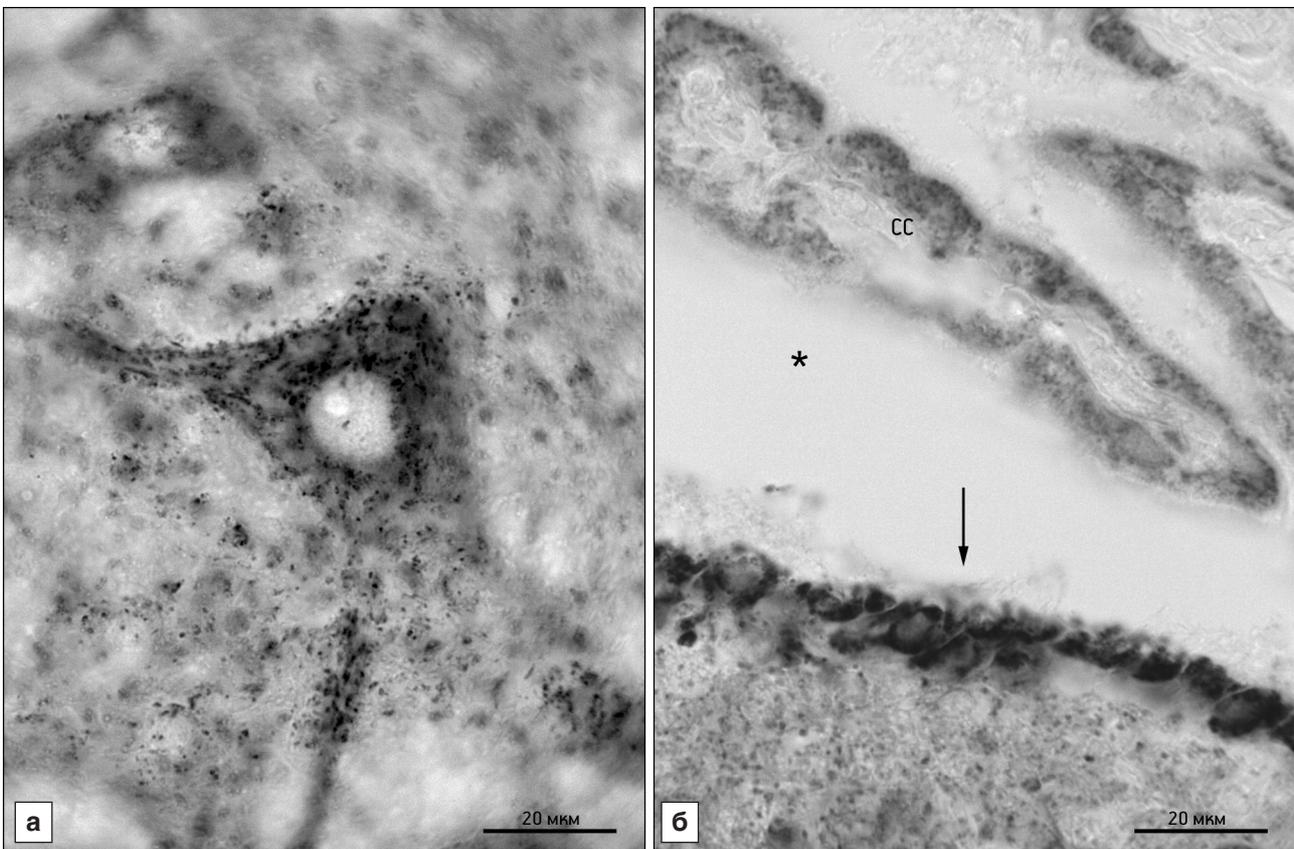
Результаты исследования. Проведение иммуноцитохимической реакции на белок HSP60 показало ее высокую селективность. Просветы кровеносных сосудов и содержимое полости желудочка были иммунонегативны. Внутренний отрицательный контроль (участки белого вещества, содержащие миелиновые нервные волокна, и соединительнотканнные компоненты стромы сосудистого сплетения) были неокрашены, тогда как нейроны и глиоциты, а также структуры нейропиля характеризовались наличием мелкозернистого иммунопозитивного материала. В цитоплазме крупных нейронов концентрация окрашенных структур была выше, чем в окружающем нейропиле (рисунки, а). Часть гранул формировали небольшие по протяженности цепочки (2–3 мкм) в цитоплазме нейронов.

Наиболее интенсивная реакция на HSP60 наблюдалась в эпендиме IV желудочка головного мозга (см. рисунок, б). При этом, в клетках эпителия сосудистого сплетения интенсивность реакции была существенно ниже. Глиоциты белого вещества продолговатого мозга (астроциты и

олигодендроциты) содержали в перинуклеарной цитоплазме небольшое число интенсивно окрашенных иммунопозитивных гранул.

Субплазмолеммального накопления иммунопозитивных структур в клетках изученных препаратов отмечено не было. За исключением эпендимоцитов, в которых из-за высокой интенсивности реакции не всегда можно было различить структурированность цитоплазматической реакции на HSP60, во всех изученных клетках и нейропиле продукт реакции всегда был мелкогранулярным, четко структурированным. Гомогенно окрашенные клетки в изученном материале отсутствовали.

Обсуждение полученных данных. Первые упоминания о присутствии белка HSP60 в стволе мозга относятся к 1998 г. [10]. В продолговатом мозгу крыс белок HSP60 был выявлен с помощью иммуноблоттинга и продемонстрирована динамика его изменения в постнатальном онтогенезе [9, 10]. В проведенном иммуногистохимическом исследовании отмечен факт присутствия белка HSP60 в нейронах ствола мозга крысы, но не представлены изображения HSP60-иммунопозитивных клеток, не дано описание характера распределения продукта реакции [10].



Нейрон продолговатого мозга крысы (а) и участок стенки IV желудочка (б).

Стрелка — эпендима; звездочка — полость желудочка; СС — сосудистое сплетение. Иммуноцитохимическая реакция на белок HSP60

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что для белка HSP60 характерно дискретное распределение в цитоплазматических структурах нейронов и глиоцитов. В крупных нейронах, благодаря локальной аккумуляции HSP60, можно проследить линейные структуры, которые, вероятно, являются митохондриями. Электронно-микроскопические исследования [7] показывают, что в пределах митохондрий наблюдается неравномерность в распределении HSP60. Вероятно поэтому реакция на HSP60 не позволяет четко визуализировать весь митохондриальный аппарат изучавшихся нами клеток, хотя отдельные структуры, по размерам соответствующие митохондриям, могут быть определены.

Важным наблюдением является отсутствие цитозольной реакции в нейронах и глиоцитах продолговатого мозга. Этот факт является основанием для использования реакции на HSP60 в комплексных исследованиях апоптоза нервных клеток, поскольку при нем должно происходить накопление цитозольного HSP60 [8] и смещение иммунопозитивного продукта к плазмолемме [11].

Высокая концентрация митохондриального белка HSP60 в эпендимоцитах, в сравнении с нейронами и эпителием сосудистого сплетения, не может быть объяснена большим развитием митохондриального аппарата, поскольку это не согласуется с данными электронно-микроскопических исследований [4]. Имеющиеся сведения о взаимосвязи накопления внемитохондриального HSP60 с процессом секреции в клетках гипофиза и поджелудочной железы [7] позволяют предположить, что белок HSP60 в эпендиме в норме необязательно связан с митохондриями. Он необходим и для участия в секреторных процессах на уровне ликворорэнцефалического барьера.

Таким образом, в продолговатом мозгу крысы белок HSP60 присутствует только в клетках. Вне клеток у интактных животных этот белок отсутствует. Характер распределения иммунопозитивного продукта в цитоплазме крупных нейронов (мелкогранулярный продукт без тенденции к концентрации вблизи плазмолеммы) позволяет использовать реакцию на белок HSP60 с целью определения его накопления в цитозоле и перемещения к плазмолемме — явлений, предшествующих гибели клетки.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Гиляров А. В. Ядерный белок NeuN в амилоидных тельцах головного мозга человека // Морфология. 2007. Т. 131, вып. 2. С. 75–76

2. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гилерович Е. Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85
3. Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Кирик О. В. и др. Сравнительные аспекты структурной организации астроцитов первого слоя коры головного мозга человека и крысы // Журн. эволюц. биохим. 2012. Т. 48, вып. 3. С. 280–286
4. Brightman M. W., Palay S. L. The fine structure of ependyma in the brain of the rat // J. Cell Biol. 1963. Vol. 19. P. 415–439
5. Brooss P., Magnoni R., Bie A. S. Molecular chaperone disorders: defective Hsp60 in neurodegeneration // Curr. Top. Med. Chem. 2012. Vol. 12, № 22, P. 2491–2503.
6. Cappello F., de Macario E. C., Zummo G., Macario A. J. Immunohistochemistry of human HSP60 in health and disease: from autoimmunity to cancer // Methods Mol. Biol. 2011. Vol. 787. P. 245–254.
7. Cechetto J. D., Soltys B. J., Gupta R. Localization of mitochondrial 60-kD heat shock chaperonin protein (HSP60) in pituitary growth hormone secretory granules and pancreatic zymogen granules // J. Histochem. Cytochem. 2000. Vol. 48, № 1. P. 45–56.
8. Chandra D., Choy G., Tang D. G. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3 // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 43. P. 31289–31301.
9. Chang A. Y., Chan J. Y., Chou J. L., Li F. C., Dai K. Y., Chan S. H. Heat shock protein 60 in rostral ventrolateral medulla reduces cardiovascular fatality during endotoxaemia in the rat // J. Physiol. 2006. Vol. 574, Pt. 2. P. 547–564.
10. D'Souza S. M., Brown I. R. Constitutive expression of heat shock proteins HSP90, HSC70, HSP70 and HSP60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development // Cell Stress Chaperones. 1998. Vol. 3, № 3. P. 188–199.
11. Goh Y. C., Yap C. T., Huang B. H. et al. Heat-shock protein 60 translocates to the surface of apoptotic cells and differentiated megakaryocytes and stimulates phagocytosis // Cell Mol. Life Sci. 2011. Vol. 68, № 9. P. 1581–1592.

Поступила в редакцию 27.11.2015
Получена после доработки 13.03.2017

MITOCHONDRIAL HSP60 PROTEIN IN THE CELLS OF THE RAT BRAINSTEM

*D. E. Korzhevskiy^{1,2}, V. V. Gusel'nikova¹, I. P. Grigoriyev¹,
O. V. Kirik¹*

HSP60 protein belongs to the group of heat shock proteins (HSP) and is located mainly in the mitochondria. In the nervous system, dysfunction and inadequate synthesis of HSP60 cause the neurodegeneration. The purpose of this work was an immunohistochemical study of the localization of HSP60 protein in rat brainstem neurons and glial cells. The study was performed on adult male Wistar rats weighing 200–250 g (n=7). The results obtained show a discrete distribution of HSP60 protein in cytoplasmic structures of neurons and glial cells. In large neurons, due to local accumulation of HSP60, it was possible to trace small structures that probably represented the mitochondria. An important observation was the lack of the cytosolic reactions in neurons and gliocytes of the medulla oblongata. This fact is the

basis for the use of reaction demonstrating HSP60 in the complex studies of nerve cell apoptosis, since apoptosis should be accompanied by cytosolic HSP60 accumulation and the displacement of the immunopositive product to plasma membrane.

Key words: *HSP60, immunohistochemistry, brainstem*

¹ Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology, St. Petersburg State University

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.171-053.2/5(470.6)

Н.С.Бахарева, Г.Ю.Шантыз, Д.Р.Черкесова, А.К.Керимова

ОСОБЕННОСТИ ДОЛЖНОГО ЧИСЛА СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ У ДЕТЕЙ ПЕРИОДА «ПЕРВОЕ ДЕТСТВО» СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНА РОССИИ

Кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. С.Е.Байбаков), ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», г. Краснодар

Целью данной работы являлось определение особенностей должного числа сердечных сокращений (ДЧСС) у детей периода «первое детство», относящихся к Северо-Кавказскому региону России. Установлено отсутствие у детей этой возрастной группы гендерных различий показателей ДЧСС и площади поверхности тела; выявлена обратная зависимость между площадью поверхности тела и ДЧСС, а также отклонение текущей частоты сердечных сокращений (ТЧСС) от ДЧСС на 30% и более у половины обследованных детей.

Ключевые слова: *должное число сердечных сокращений, первое детство, Северо-Кавказский регион*

Детский возраст представляет собой «стратегический» этап жизни, закономерно определяющий ее дальнейшее качество и позволяющий прогнозировать вероятность дальнейшего развития [3]. Текущая частота сердечных сокращений (ТЧСС) — один из основных параметров оценки функционального состояния организма, однако выраженность сдвигов ТЧСС может быть оценена только при точном знании должного числа сердечных сокращений (ДЧСС). Разброс ДЧСС, по данным литературы, достаточно велик [2]. При исследовании ТЧСС у детей следует ориентироваться не на возраст ребенка, а на длину и массу его тела, прямо определяющих уровень ДЧСС [6].

Целью данной работы являлось определение особенностей должного числа сердечных сокращений (ДЧСС) у детей периода «первое детство»,

относящихся к Северо-Кавказскому региону России.

Материал и методы. Были использованы данные длины и массы тела 100 детей (50 девочек и 50 мальчиков) в возрасте $6,1 \pm 0,4$ года (кабардинцев и балкарцев). Исследования проводили на базе детского сада № 1 г. п. Чегем, Кабардино-Балкарской Республики. На данное исследование получено разрешение этического комитета (№ 49 лъ 24.03.2017 г.). ДЧСС и площадь поверхности тела определяли по формулам, разработанным Ю.Р.Шейх-заде [4, 5]. Цифровой материал обработан методом вариационной статистики в рамках программы Microsoft Excel.

Результаты исследования. Проведенный статистический анализ не выявил значимых различий в значениях ДЧСС между группами мальчиков ($77,4 \pm 0,5$ мин⁻¹) и девочек ($78,2 \pm 0,6$ мин⁻¹). Значения площадей поверхности тела у мальчиков и у девочек также значимо

Сведения об авторах:

Бахарева Нина Семеновна (e-mail: bahareva_1955@mail.ru), Шантыз Гисса Юсуфович, кафедра нормальной анатомии, Черкесова Диана Руслановна, студентка IV курса, лечебный факультет, Керимова Анна Керимовна, студентка II курса, фармацевтический факультет, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4