

НЕЙРОГЛОБИН В НЕЙРОНАХ ПОЯСНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ



¹Т. В. Климуть, ¹А. В. Заерко, ²С. В. Емельянчик, ¹С. М. Зиматкин

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Введение. Изучение нейроглобина поможет понять механизмы нейропротекции и энергетического метаболизма в нейронах разных слоев поясной коры при холестазах.

Цель исследования – оценить иммунореактивность нейроглобина в нейронах поясной коры головного мозга крысы при холестазах.

Материал и методы. Исследовали нейроны 2-го и 5-го слоев переднего отдела поясной коры мозга крыс в разные сроки после перевязки/перерезки у них общего желчного протока или ложной операции (контроль). Использовали гистологический, иммуногистохимический, морфометрический, статистический методы.

Результаты. Иммунореактивность нейроглобина в нейронах 2-го и 5-го слоев переднего отдела поясной коры мозга крысы после перерезки общего желчного протока изменяется волнообразно, достигая пиков на 5 и 10-е сутки в мелкоклеточном слое и на 10 и 20-е сутки в крупноклеточном слое, затем снижается и возвращается к контрольным значениям к 90-м суткам.

Заключение. Нейроны мелкоклеточного слоя (по экспрессии нейроглобина) быстрее реагируют на холестаза и раньше нормализуются после его исчезновения по сравнению с нейронами крупноклеточного слоя поясной коры.

Ключевые слова: крысы, головной мозг, поясная кора, нейроны, нейроглобин, холестаза.

NEUROGLOBIN IN CINGULATE CORTEX NEURONS OF THE RAT BRAIN IN CHOLESTASIS

¹T. V. Klimut, ¹A. V. Zaerko, ²S. V. Emelyanchik, ¹S. M. Zimatkin

¹Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

²Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Background. The study of neuroglobin will help to understand the mechanisms of neuroprotection and energy metabolism in neurons of different cingulate cortex layers in cholestasis.

Objective. To evaluate the immunoreactivity of neuroglobulin in cingulate cortex neurons of the rat brain in cholestasis.

Material and methods. Neurons of the 2nd and 5th layers of the anterior cingulate cortex of the rat brain were studied at different times after ligation/transection of the common bile duct (CBD) or sham surgery (control). Histological, immunohistochemical, morphometric, and statistical methods were used.

Results. Immunoreactivity of neuroglobin in neurons of the 2nd and 5th layers of the anterior cingulate cortex of the rat brain after transection of the common bile duct changes in a wave-like manner, reaching peaks on the 5th and 10th days in the small-cell layer and on the 10th and 20th days in the large-cell layer, then it decreases and returns to control values by the 90th day.

Conclusion. Neurons of the small-cell layer (according to neuroglobin expression) react more quickly to cholestasis and normalize sooner after its disappearance, compared with neurons of the large-cell layer of the cingulate cortex.

Keywords: rats, brain, cingulate cortex, neurons, neuroglobin, cholestasis.

Автор, ответственный за переписку:

Климуть Татьяна Викторовна, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: klimuts@yandex.ru, ORCID: 0009-0001-5670-9030

Corresponding author:

Klimut Tatyana, Grodno State Medical University, e-mail: klimuts@yandex.ru, ORCID: 0009-0001-5670-9030

Для цитирования: Нейроглобин в нейронах поясной коры мозга крысы при холестазах / Т. В. Климуть, А. В. Заерко, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Гепатология и гастроэнтерология. 2024. Т. 8, № 2. С. 90-95. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-2-90-95>.

For citation: Klimut TV, Zaerko AV, Emelyanchik SV, Zimatkin SM. Neuroglobin in cingular cortex neurons of the rat brain with cholestasis. *Hepatology and Gastroenterology*. 2024;8(2):90-95. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-2-90-95>.

Введение

Холестаз – патологическое состояние, характеризующееся нарушением оттока желчи, приводящее не только к нарушению пищеварения в кишечнике, но и к повышенному поступлению компонентов желчи (билирубин, желчные кислоты, холестерин) в кровь, что приводит к многочисленным системным токсическим эффектам, включая воздействие на центральную нервную систему [1]. Поясная кора, играющая важную роль в когнитивных процессах и эмоциональной регуляции, может быть уязвима к метаболическим и нейровоспалительным изменениям, вызванным холестазом. В наших предварительных исследованиях при экспериментальном холестазе у крыс обнаружены значительные изменения числа, размеров и формы нейронов поясной коры [2]. Представляло интерес выяснение нарушений молекулярных маркеров энергетического метаболизма нейронов поясной коры, которые могут лежать в основе их гибели при холестазе. Особое внимание в данной работе уделяется нейроглобину, белку, который может играть важную роль в адаптации и защите нейронов в условиях желчного застоя.

Нейроглобин (NGB) – белок, экспрессирующийся в центральной и периферической нервной системе позвоночных, является металлопротеином семейства глобинов, депонирующим и переносящим кислород к митохондриям нейронов для тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. Он способствует поддержанию кислородного гомеостаза нейронов мозга в норме, а также участвует в защите нейронов от гипоксии и оксидативного стресса, развивающихся в мозге при патологии, связывая и нейтрализуя активные формы кислорода [3].

Таким образом, изучение NGB может помочь понять механизмы нарушений энергетического метаболизма и нейропротекции в нейронах при холестазе, предоставить данные для разработки эффективных методов лечения и улучшения качества жизни пациентов при данной патологии.

Цель исследования – оценить иммунореактивность NGB в нейронах поясной коры головного мозга крысы при холестазе.

Материал и методы

В работе использованы 72 беспородные белые крысы самца массой 225 ± 25 граммов (по 6 контрольных и 6 опытных животных на каждый срок). Животных содержали в стандартных условиях вивария Гродненского государственного медицинского университета, в клетках со свободным доступом к воде и полноценной пище. Исследование проведено в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использу-

емых для научных целей [4]. На проведение данного исследования получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета, протокол № 1 от 11.01.2024.

Для моделирования подпеченочного холестаза использовали перерезку общего желчного протока (ОЖП) между двумя лигатурами на 2-3 мм ниже места слияния печеночных протоков по методу Л. С. Кизюкевича [5]. Перевязка/перерезка ОЖП выше этого уровня может не приводить к полному холестазу, а ниже в него впадают многочисленные протоки поджелудочной железы, перевязка которых приводит к развитию панкреатита и быстрой гибели всех животных [6]. Животным контрольной группы проводили ложную операцию с сохранением физиологического оттока желчи в двенадцатиперстную кишку на протяжении всего эксперимента. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы опытных и контрольных животных синхронно выводили из эксперимента путем декапитации, предварительно усыпив парами эфира. Для исследования брали кусочки больших полушарий головного мозга, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при $+4^{\circ}\text{C}$ (на ночь), затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (Leica RM 2125 RTS, Германия), монтировали на предметные стекла [7]. Срезы обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии без теплового демаскирования антигенов [8].

Для иммуногистохимического выявления NGB применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Ngb antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:600 (выбрано в предварительном исследовании как оптимальное) при $+4^{\circ}\text{C}$, экспозиция 20 ч, во влажной камере [9]. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для идентификации поясной коры крысы применяли схемы стереотаксического атласа [10]. Цитофотометрию нейронов проводили во 2-м, мелкоклеточном и 5-м крупноклеточном слоях переднего отдела поясной коры [11].

Гистологические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica (DFC 320, Германия), а также программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

В результате морфометрических исследований получены количественные непрерывные данные. Их обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0

для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер AXAR207F394425FA-Q) с применением описательной статистики. Так как в эксперименте нами использовались малые выборки, которые не всегда имели нормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики. Для каждого показателя определяли значение медианы (Me), значение нижнего квартиля (LQ), значение верхнего квартиля (UQ) и интерквартильного диапазона (IQR). Объекты исследования набирали в группы независимо друг от друга, поэтому сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$; где p – критическое значение уровня значимости) [12].

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что во 2-м, мелко-клеточном слое переднего отдела поясной коры в цитоплазме нейронов, окрашенных на выявление NGB, отмечалась неравномерная окраска продуктов иммуногистохимической реакции. Ядра данных клеток были иммунонегативны.

В опытной группе изменения содержания NGB в перикарионах нейронов имели волнообразный характер. Так, на 5 и 10-е сутки холестаза отмечалось усиленное по сравнению с контролем иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы (рис. 1).

На 20 и 45-е сутки преобладали нейроны, которые имели слабо выраженную иммунопозитивную реакцию цитоплазмы их перикарионов. При этом ядра нейроцитов во все сроки были иммунонегативны.

При этом содержание NGB в цитоплазме изучаемых нейронов через 5 суток после перерезки ОЖП достоверно увеличивалось – на 11,5%, а на 10-е сутки – на 24% по сравнению с контрольными животными в эти же сроки. На более поздних сроках, на 20 и 45-е сутки, наблюдалось значимое снижение оптической плотности NGB на 11,1 и 14,8%, соответственно, при сравнении с контролем тех же сроков. На 90-е сутки холестаза данный показатель приходит в норму (рис. 2).

В 5-м, крупноклеточном слое переднего отдела поясной коры в цитоплазме нейронов отмечается умеренное диффузное неравномерное окрашивание на выявление NGB.

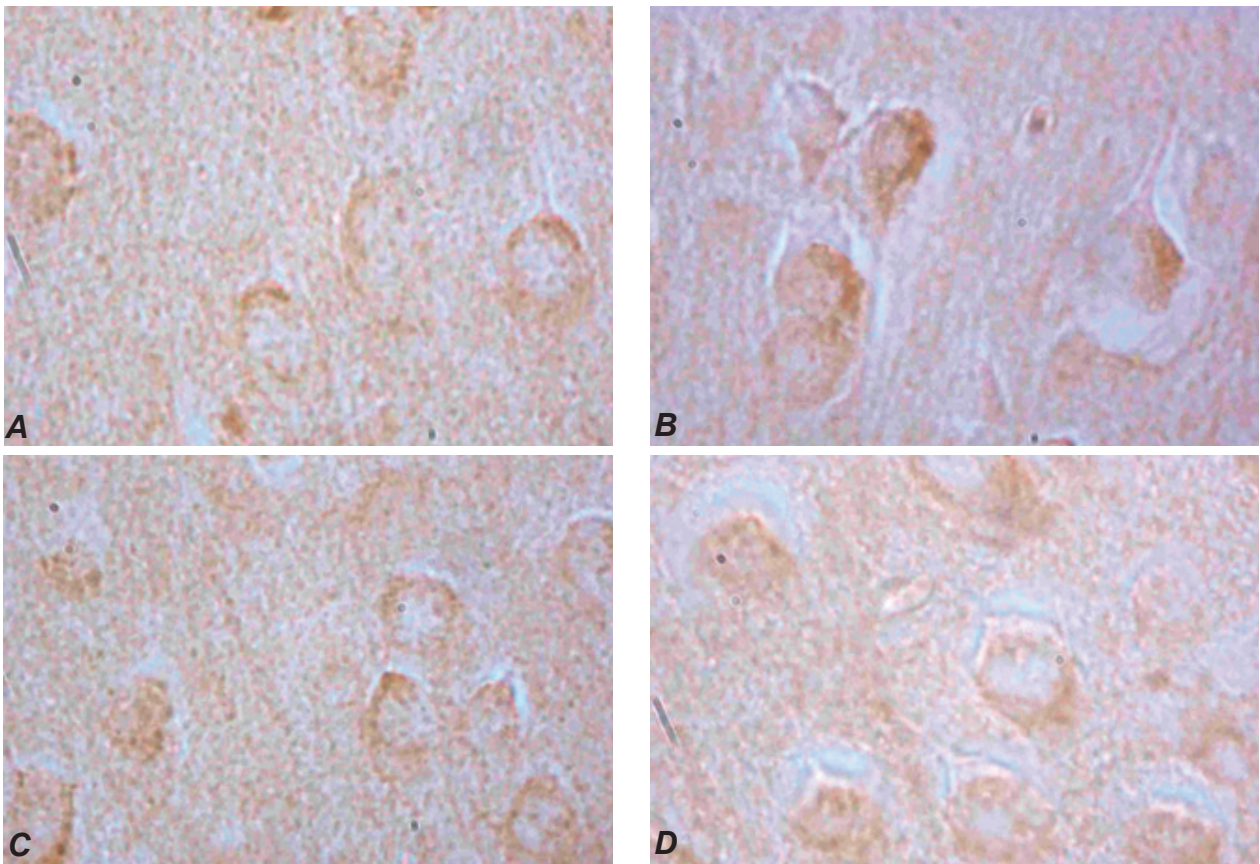


Рисунок 1. – Содержание Ngb в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры крыс на 10-е сутки эксперимента в контрольной (A) и опытной группах (B); и на 20-е сутки после операции в контрольной (C) и опытной группах (D). Иммуноцитохимическая реакция на Ngb, $\times 1000$
Figure 1. – The content of Ngb in the neurons of the small cell layer of the cingulate cortex of the rat brain on the 10th day of the experiment in the control (A) and experimental group (B); and on the 20th day after surgery in the control (C) and experimental groups (D). Immunocytochemical reaction to Ngb, $\times 1000$

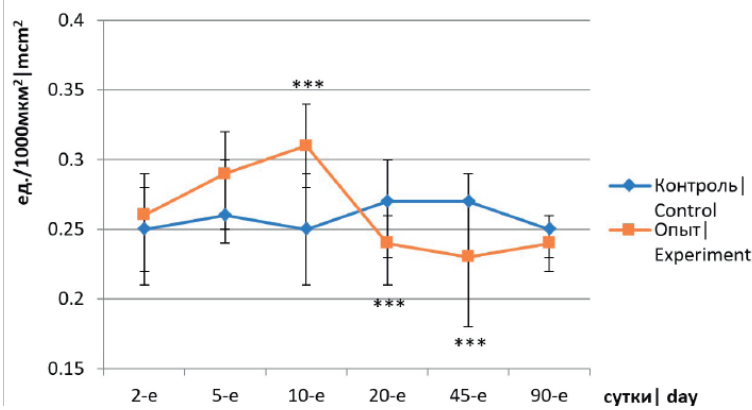


Рисунок 2. – Изменения содержания Ngb в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры после перевязки ОЖП
 Примечание: *** – $p < 0,001$, при сравнении с контролем того же срока
Figure. 2. – Changes in Ngb content in neurons of the parvocellular layer of the cingulate cortex after CBD ligation.
 Note: *** – $p < 0,001$, when compared with control of the same period

В опытной группе изменение содержания NGB имело волнообразный характер. Так, на 10 и 20-е сутки холестаза отмечается усиленное, по сравнению с контролем, накопление иммунореактивного материала в виде глыбок, гетерогенно распределенных в цитоплазме. На 45-е сутки после перерезки ОЖП нейроны имеют более слабую иммунопозитивную окраску (рис. 3).

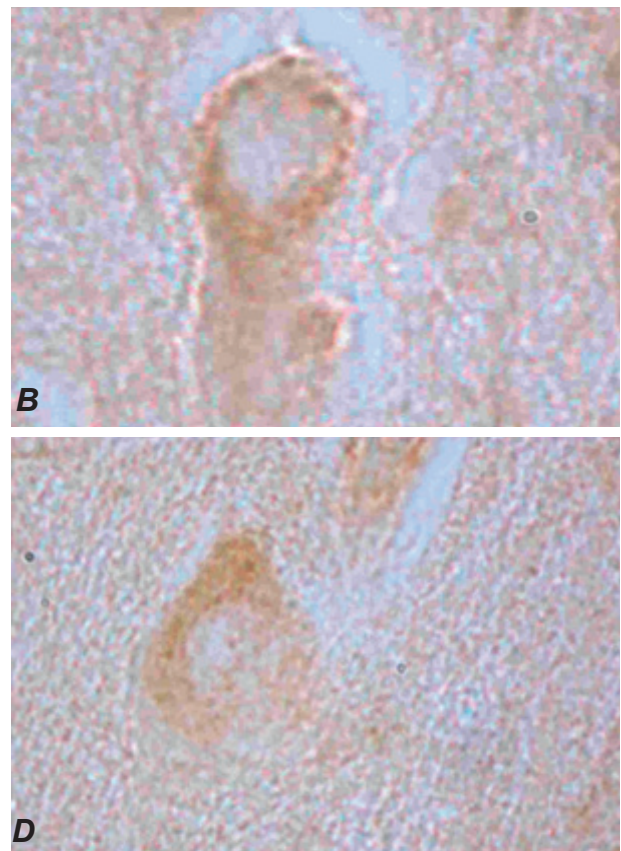
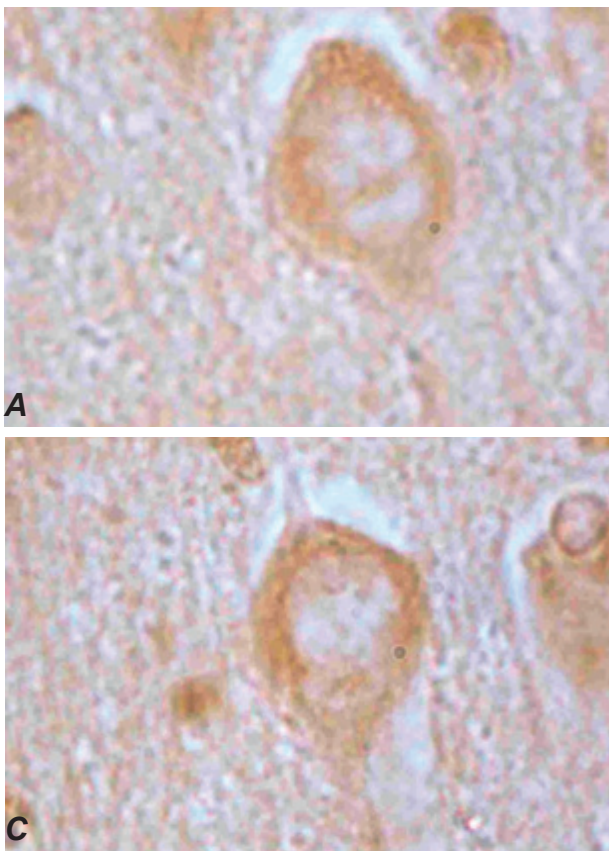


Рисунок 3. – Содержание Ngb в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры крыс на 10-е сутки эксперимента в контрольной (А) и опытной группах (В); и на 45-е сутки после операции в контрольной (С) и опытной группах (D). Иммуноцитохимическая окраска на нейроглобин, $\times 1000$
Figure. 3. – The content of Ngb in the neurons of the magnocellular layer of the cingulate cortex of the rat brain on the 10th day of the experiment in the control (A) and experimental group (B); and on the 45th day after surgery in the control (C) and experimental groups (D). Immunocytochemical reaction to Ngb, $\times 1000$

В нейронах этого слоя содержание NGB в цитоплазме на 10 и 20-е сутки холестаза повышено на 13,8 и 6,7%. Уменьшение окраски NGB в цитоплазме нейронов достоверно на 45-е сутки на 24,1%. На 90-е сутки оно нормализуется (рис. 4).

В нейронах 2-го, мелкоклеточного, и 5-го, крупноклеточного слоев переднего отдела поясной коры мозга крысы изменение иммунореактивности нейроглобина носит волнообразный характер. Причем экспрессия данного маркера после перерезки ОЖП возрастает в мелкоклеточном слое на 5 и 10-е сутки, а в крупноклеточном – на 10 и 20-е сутки, что совпадает с пиком холестаза по результатам биохимического анализа крови животных.

Далее в динамике холестаза иммунореактивность нейроглобина снижается в мелкоклеточном слое, начиная с 20-х, а в крупноклеточном – с 45-х суток. К 90-м суткам данный показатель близок к контрольным значениям в обоих слоях. Это совпадает с постепенным ослаблением и исчезновением холестаза из-за разрастания об-

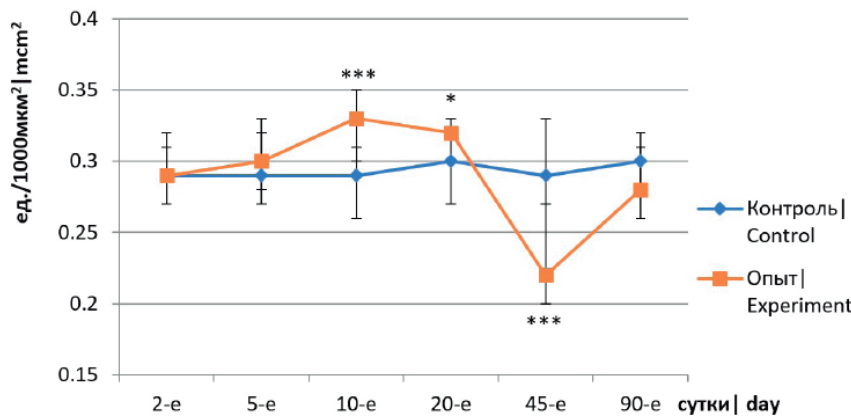


Рисунок. 4. – Изменения содержания Ngb в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры после перевязки ОЖП
Примечание: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ при сравнении с контролем того же срока.
Figure. 4. – Changes in Ngb content in neurons of the magnocellular layer of the cingulate cortex after CBD ligation
Note: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, when compared with control of the same period.

ходных желчевыводящих протоков у выживших животных.

Нейроглобин, который играет важную роль в обеспечении кислородного гомеостаза клеток мозга, также может участвовать в защите нейронов от окислительного стресса и апоптоза [3]. Отмеченное нами повышение уровня нейроглобина в нейронах поясной коры в первые дни после перерезки ОЖП может быть связано с адаптацией нейронов к токсическому действию компонентов желчи, попыткой защититься от повреждений. Возрастание этого белка в цитоплазме нейронов может отражать активацию нейропротекторных механизмов, таких как связывание кислородных радикалов и подавление митохондриальных факторов апоптоза [13]. Описано, что сверхэкспрессия Ngb защищает нейроны от гипоксии/ишемии [14], а снижение экспрессии Ngb увеличивает гипоксическое повреждение нейронов *in vitro* и ишемическое повреждение [15]. Описанное нами снижение уровня нейроглобина

в отдаленные сроки после перерезки ОЖП может свидетельствовать об истощении адаптивных ресурсов нейронов поясной коры, их повреждения и дальнейшей гибели. Это подтверждается нашим предыдущим исследованием, в котором описано значительное уменьшение числа нейронов поясной коры после экспериментального холестаза [2]. Тот факт, что к 90-м суткам данный показатель близок к контрольным значениям в обоих слоях, вероятно, связан с устранением холестаза (что подтверждается биохимическим анализом крови животных) в связи с прорастанием обходных желчных протоков и восстановлением оттока желчи в 12-перстную кишку и может указывать на постепенное возвращение выживших нейронов к нормальной функции и стабилизацию их состояния, а также отражает высокие адаптационные возможности выживших нейронов переднего отдела поясной коры [16].

Выводы

После перерезки ОЖП у крыс в динамике холестаза, в нейронах мелкоклеточного и крупноклеточного слоя переднего отдела поясной коры волнообразно изменяется содержание нейроглобина: нарушения появляются на 2-5-е сутки после операции, достигают максимума на 10-20-е сутки, а затем постепенно нормализуются к 90-м суткам. Нейроны мелкоклеточного слоя быстрее реагируют на холестаз и раньше нормализуются после исчезновения NGB по сравнению с нейронами крупноклеточного слоя поясной коры.

References

- Eslimi Esfahani D, Zarrindast MR. Cholestasis and behavioral disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2021;14(2):95-107.
- Klimut TV, Zaerko AV, Emelyanchik SV, Zimatkin SM. Gistologicheskie izmeneniya neuronov pojasnoj kory mozga krysy pri holestaze [Histological changes in neurons of the cingulate cortex of the rat brain in cholestasis]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences]. 2024;24(2):75-83. edn: ENZFKM. (Russian).
- García-García F, Acosta-Hernández ME, Beltrán-Parrazal L, Rodríguez-Alba JC. The Role of Neuroglobin in the Sleep-Wake Cycle. *Sleep Sci.* 2023;16(3):e362-e367. doi: 10.1055/s-0043-1772806.
- European Parliament, Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (text with EEA relevance 20.10.2010). *Official Journal of the European Union.* 2010;63:1-47.
- Kizyukevich LS. Reaktivnye izmeneniya v pochkah pri jeksperimentalnom holestaze. Grodno: GrSMU; 2005. 239 p. edn: NBMDLT. (Russian).
- Kizyukevich LS. Prichiny razvitija poliorgannoj nedostatochnosti pri hirurgicheskoj patologii zhelchevyvodjashhih putej [Reasons for the development of multiple organ failure in surgical pathology of the biliary tract]. *Vesci Nacyjananaj akadziejii navuk Belarusi. Seryja medycynskih navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine Series]. 2005;2:118-121. edn: HSHAPL. (Russian).
- Korzhevskiy DE, Grigoriev IP, Otellin VA. Primenenie obezvozhivajushhih fiksatorov, sodержashhih soli cinka, v nevrogistologicheskikh issledovanijah [The use of dehydrating fixatives containing zinc salts in neurohistological studies]. *Morfologija* [Morphology]. 2006;129(1):85-86. edn: KVLZUR. (Russian).
- Korzhevskiy DE, Kirik OV, Petrova ES, Karpenko MN, Grigorev IP, Suhorukova EG, Kolos EA, Giljarov AV. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie met-

- odov immunogistohimii. 2nd ed. Korzhevskiy DE, editor. St. Petersburg: SpetsLit; 2014. 118 p. edn: SINOMT. (Russian).
9. Kirik OV, Grigorev IP, Alekseeva OS, Korzhevskiy DE. Trehmernaja organizacija citoplazmicheskih nejroglobin-immunopozitivnyh struktur nejronov prodolgovatogo mozga krysy [Three-dimensional organization of the cytoplasmic neuroglobin-immunopositive structures in the rat medulla oblongata neurons]. *Biologicheskie membrany* [Biological membranes]. 2016;33(3):207-212. doi: 10.7868/S0233475516030063. edn: VVGFSX. (Russian).
 10. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 448 p.
 11. Banina VV, Bykova VL, editors. Terminologija Histologica. Mezhdunarodnye terminy po citologii i gistologii cheloveka s oficialnym spiskom russkih jekvivalentov. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 272 p. (Russian).
 12. Omelchenko VP, Demidova AA. Informatika, medicinska-ja informatika, statistika. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. 608 p. (Russian).
 13. Uzlova EV, Zimatkin SM, Bon EI. Soderzhanie nejroglobina v strukturah golovnogo mozga krysy pri subtotalnoj ishemii [Neuroglobin content in rat brain structures after subtotal cerebral ischemia]. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2023;165(2):204-215. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.204-215. edn: TXEZGO. (Russian).
 14. Gorabi AM, Aslani S, Barreto GE, Báez-Jurado E, Kiaie N, Jamialahmadi T, Sahebkar A. The potential of mitochondrial modulation by neuroglobin in treatment of neurological disorders. *Free Radic Biol Med*. 2021;162:471-477. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.002.
 15. Li SQ, Li WB, Zhang MZ, Hu YY. The Role of Neuroglobin in the Neuroprotection of Limb Ischemic Preconditioning in Rats. *Molecular Neurobiology*. 2012;47(1):197-208. doi:10.1007/s12035-012-8373-7.
 16. Zimatkin SM, Emelyanchik SV. Nejrony mozga pri narushenijah cirkuljacii zhelchi. Grodno: GrSMU; 2021. 368 p. edn: TIYPUZ. (Russian).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Климуть Татьяна Викторовна, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: klimuts@yandex.ru, ORCID: 0009-0001-5670-9030

Заерко Анастасия Викторовна, канд. биол. наук, Гродненский государственный медицинский университет, ORCID: 0000-0001-6155-040X

Емельянич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, ORCID: 0009-0009-3032-8203

Зиматкин Сергей Михайлович, д-р биол. наук, проф., Гродненский государственный медицинский университет, ORCID: 0000-0001-5728-2588

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was performed without external funding.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about authors:

Klimut Tatyana, Grodno State Medical University, e-mail: klimuts@yandex.ru, ORCID: 0009-0001-5670-9030

Zaerko Anastasia, PhD (Biology), Grodno State Medical University, ORCID: 0000-0001-6155-040X

Emelyanchik Sergey, PhD, MD (Biology), Professor, Yanka Kupala State University of Grodno, ORCID: 0009-0009-3032-8203

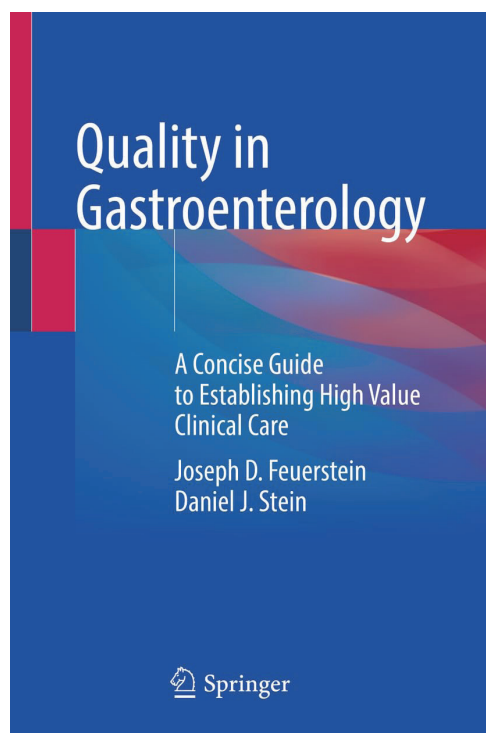
Zimatkin Sergey, PhD, MD (Biology), Professor, Grodno State Medical University, ORCID: 0000-0001-5728-2588

Поступила: 08.08.2024

Принята к печати: 25.09.2024

Received: 08.08.2024

Accepted: 25.09.2024



Quality in Gastroenterology: A Concise Guide to Establishing High Value Clinical Care / ed.: J. D. Feuerstein, D. J. Stein. – Cham : Springer, 2024. – 583 p. – ISBN 978-3-031-58491-6.

This book is an all-in-one resource on providing and establishing high quality care in clinical gastroenterology. The text provides an in-depth analysis of not just guideline-based care, which is usually covered in shorter articles, but a combination of guidelines, quality metrics, and general standard of care in all areas of clinical practice and endoscopy. The book also covers high quality care for specific gastrointestinal disease states, such as inflammatory bowel disease, motility disorders, and pancreatic diseases, reviewing the appropriate timing of procedures for those conditions. Each chapter features a table of key quality measures for easy use and access. The chapters also discuss avoiding overuse of procedures, as well as instances where it may not be indicated to perform procedures. In addition, this volume combines the standards put forth by many different societies and groups into a single source for providers to use as a blueprint for standards of high quality care. Quality in Gastroenterology summarizes everything a practicing clinician needs for providing high quality care in one convenient place.