

DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-24-29



УДК 547.96:612.825.015]:616.36–008.811.6]–092.9
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
© С.В. Емельянчик, О.А. Карнюшко, С.М. Зиматкин, 2020

Нейроглобин в нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при холестазе

С. В. Емельянчик¹, О. А. Карнюшко^{2*}, С. М. Зиматкин²

УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы», Гродно,
Республика Беларусь

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

Цель исследования – изучить распределение и содержание нейроглобина в пирамидных нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при экспериментальном холестазе.

Материал и методы. Исследование выполнено на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 г. Модель холестаза создавали путем перевязки общего желчного протока в области ворот печени (основная группа, n=30). Контрольным животным проводили ложную операцию (n=30) с сохранением физиологического оттока желчи. Для исследования брали участки лобной и теменной коры головного мозга белых крыс. Содержание и распределение нейроглобина выявляли иммуногистохимически на парафиновых срезах с помощью первичных моноклональных мышиных антител Anti-Neuroglobin antibody (Abcam). Количественную оценку содержания изучаемого молекулярного маркера проводили цитофотометрически с последующим статистическим анализом.

Результаты. Установлено, что после перевязки общего желчного протока содержание нейроглобина в перикарионах нейронов лобной и теменной коры головного мозга изменялось волнообразно. В лобной коре содержание нейроглобина значительно уменьшалось через 2, 10 и 45 сут (минимум на 10-е сут) после перевязки общего желчного протока, а в теменной коре и на 90-е сут, и увеличивалось на 5-е и 20-е сут эксперимента (максимум на 20-е сут).

Заключение. При холестазе содержание нейроглобина в перикарионах нейронов лобной и теменной коры мозга изменяется волнообразно: на 2-, 10-, 45-е – наблюдается уменьшение, на 5- и 20-е сут – увеличение его содержания, и к 90-м сут – восстановление.

Ключевые слова: нейроглобин, кора головного мозга, нейроны, холестаз, крысы.

Neuroglobin in Neurons of the Frontal and Parietal Cortex of White Rats in Cholestasis

© S. V. Emel'yanchik¹, O. A. Karnyushko^{2*}, S. M. Zimatkin², 2020

¹Y. Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

The aim of the study was to investigate the distribution and content of neuroglobin in the pyramidal neurons of the frontal and parietal cortex of white rats during simulated cholestasis.

Material and methods. The study included 60 outbred white male rats weighed 200–250 g. Cholestasis was simulated by ligation of the common bile duct in the porta hepatis area (main group, n=30). Animals of the control group (n=30) were performed a false operation preserving physiological bile outflow. Sections of the frontal and parietal cortex of white rats were selected for investigation. The content and distribution of neuroglobin was detected immunohistochemically on paraffin sections using mouse monoclonal primary antibodies Anti-Neuroglobin antibody (Abcam). Cytophotometric analysis was used to perform quantitative assessment of the content of the studied molecular marker; after that statistical analysis was performed.

Results. It was found that the content of neuroglobin in the pericarions of neurons of the frontal and parietal cortex modified in a wave-like mode. After ligation of the common bile duct, the content of neuroglobin significantly decreased in 2, 10 and 45 days (minimum on the 10th day) in the frontal cortex and in 90 days in the parietal cortex, and increased in 5 and 20 days of the experiment (maximum on the 20th day).

Conclusion. In cholestasis, the content of neuroglobin in the pericarions of neurons of the frontal and parietal cortex modifies in waves: a decrease is observed on the 2nd, 10th, 45th day; an increase is observed on the 5th and 20th day; a recovery is observed on the 90th day.

Key words: neuroglobin, cerebral cortex, neurons, cholestasis, rats.

*Автор для переписки:

Карнюшко Ольга Анатольевна
Гродненский государственный медицинский университет,
ул. Горького, 80, г. Гродно, 230009, Республика Беларусь
E-mail: karnyushko-olga@mail.ru

*Corresponding author:

Ol'ga Karnyushko
Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo, 80, Grodno,
230009, Republic of Belarus
E-mail: karnyushko-olga@mail.ru

Введение

В последние десятилетия в развитых странах отмечается неуклонный рост патологии гепатобилиарной системы. Нередко такое состояние сопровождается холестазом, который проявляется застоем желчи в желчевыводящих путях, нарушающим ее отток из печени в двенадцатиперстную кишку. Довольно

часто этому может способствовать желчекаменная болезнь. При холестазах страдают все системы и органы организма, включая головной мозг. Окислительный стресс, уже на ранних этапах проявляется структурно-функциональными изменениями внутриклеточных органелл нейронов, особенно митохондрий [1]. Как известно, митохондрии играют важную роль в нескольких различных процессах, включая клеточное дыхание, производство энергии, образование свободных радикалов и апоптоз, тем самым регулируя клеточный гомеостаз. Поэтому дисфункция этих органелл является решающей в запуске целого ряда нейродегенеративных заболеваний [7, 10]. Белок нейроглобин служит для депонирования и переноса кислорода к митохондриям нейронов, а при патологии предотвращает нейродегенерацию через антиоксидантные и антиапоптотические механизмы. Нейроглобин участвует в транспорте кислорода и свободных радикалов в нейронах и способствует поддержанию кислородного гомеостаза мозга при различных воздействиях. Он связывает и нейтрализует активные формы кислорода, количество которых увеличивается при развитии оксидативного стресса, ишемии/гипоксии мозга, выступая как нейротектор, и может оказывать влияние на клеточное дыхание [4]. Благодаря своим антиоксидантным свойствам, он может защищать нервную ткань при ишемии-реперфузии [9]. Нейроглобин влияет на некоторые метаболические пути, включая поддержание ионного гомеостаза, энергетического метаболизма и передачу клеточных сигналов. Нейротекторные эффекты нейроглобина подробно изложены в литературе [15]. Интересно, что уменьшение количества нейроглобина коррелирует с когнитивной дисфункцией [8]. Кроме того, показана роль нейроглобина в процессах сна и бодрствования [11]. Возможно, наблюдаемые неврологические и психические нарушения в клинике у больных с холестазом связаны именно с этим белком. В наших предыдущих исследованиях показано, что экспериментальный холестаз у крыс вызывает раннее повреждение митохондрий, глубокие структурные и метаболические нарушения в гистаминергических нейронах гипоталамуса [3], нейронах коры больших полушарий и мозжечка [1], что нередко приводит к их гибели. Экспрессию нейроглобина в этих условиях не изучали.

Цель настоящей работы – выяснить распределение и содержание нейроглобина в пирамидных нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при экспериментальном холестазе.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 60 белых крысах-самцах гетерогенной популяции

массой 200 ± 25 г. Соблюдались все правила гуманного обращения с животными. На проведение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1, от 11.01.2017). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Контрольным крысам проводили лапаротомию (т.е. проток им не перевязывали). Опытным животным лигирование общего желчного протока проводили на 3–5 мм ниже слияния долевых печеночных протоков с последующим пересечением между двумя лигатурами. Спустя 2 (n=10), 5 (n=10), 10 (n=10), 20 (n=10), 45 (n=10) и 90 (n=10) сут в одни и те же утренние часы (для синхронизации по времени) у животных извлекали головной мозг. Для получения сопоставимых результатов кусочки коры головного мозга всех животных обрабатывали синхронно и в одинаковых условиях. Проводили фиксацию в цинк-этанол-формальдегиде при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 часов, по общепринятой методике заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм готовили при помощи микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла.

Для иммуногистохимического определения нейроглобина применяли первичные моноклональные мышиные антитела Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600 (выбрано как оптимальное из серии их разных разведений в предварительных опытах), экспозиция 20 ч, при $+4^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Количественную оценку содержания нейроглобина проводили цитофотометрически на максимуме поглощения окрашенного продукта иммуногистохимической реакции в единицах оптической плотности (ед.) при ув. 1000. В качестве хромогена использовали диаминобензидин (DAB). В каждой экспериментальной группе оценивали по 150–200 нейронов. Изучение и микрофотографирование полученных препаратов проводили с использованием 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). Исследовали всегда одни и те же участки лобной коры (frontal cortex, primary motor cortex – M1; bregma – от 4.20 до 1.80 мм) и теменной коры головного мозга (temporal association cortex – TeA; bregma – от –6.84 до –8.52 мм) согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [13].

Статистический анализ проводили с помощью лицензионной компьютерной

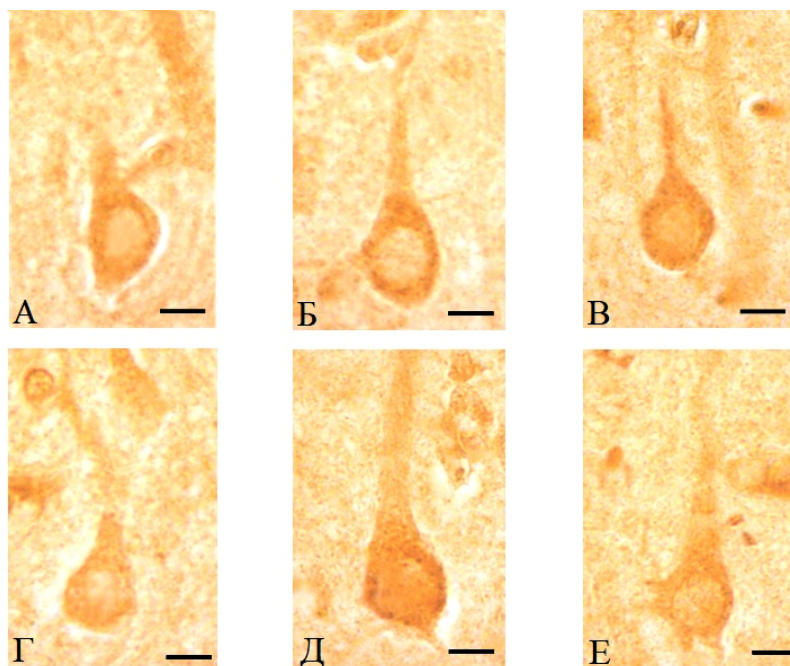


Рис. 1. Локализация и количество нейроглобина в нейронах III слоя лобной коры головного мозга белых крыс. Обозначения: А, Б, В – контроль (2-, 20-, 45-е сут), Г, Д, Е – холестаз (2-, 20-, 45-е сут). Иммуногистохимическая реакция на нейроглобин. Масштабный отрезок – 20 мкм. Ув. 1000. Цифровая микрофотография.

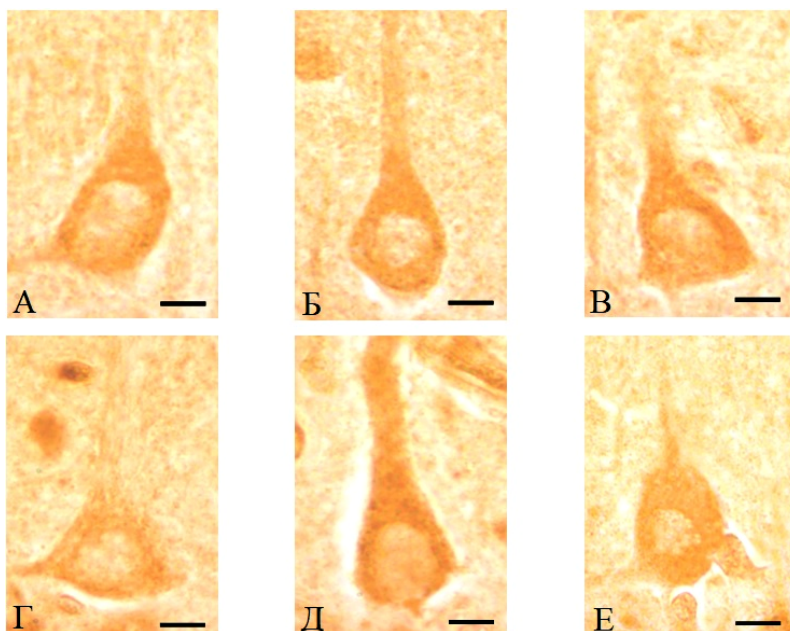


Рис. 2. Локализация и количество нейроглобина в нейронах V слоя лобной коры мозга крыс. Обозначения: А, Б, В – контроль (2-, 20-, 45-е сут), Г, Д, Е – холестаз (2-, 20-, 45-е сут). Масштабный отрезок – 20 мкм. Ув. 1000. Цифровая микрофотография.

программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Материал представлен как медиана (Me) и интерквартильный размах (IQR). Группы сравнивали по критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) для независимых выборок. Статистически значимыми считали различия между группами, когда вероятная ошибка не превышала 5% ($p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

Изучение содержания нейроглобина в коре головного мозга крыс показало, что в цитоплазме перикарионов определяются продукты иммуногистохимической реакции в виде умеренного гомогенного темно-коричневого осадка, на фоне слабо окрашенного нейропиля. В некоторых нейронах в цитоплазме продукты реакции располагаются в

виде мелких и средних размеров гранул. В тех участках, где в срез попал центральный дендрит, можно проследить его иммуноокрашивание на некотором протяжении. Ядра всех нейронов иммунонегативны (рис. 1, 2). Количество нейроглобина в перикарионах нейронов в контроле в разные сроки эксперимента варьирует незначительно.

После 2 сут холестаза в лобной коре в перикарионах нейронов II слоя происходило снижение содержания нейроглобина на 5.1%, в III слое – на 7.4% (рис. 1А, 1Г), в V слое нейронов – на 5.8% в сравнении с контролем (рис. 2А, 2Г, 3 А–В). В теменной коре в V слое нейронов происходило снижение содержания нейроглобина на 4.7%, в сравнении с контролем (рис. 4В).

После 5 сут холестаза во II слое нейронов лобной коры происходило увеличение

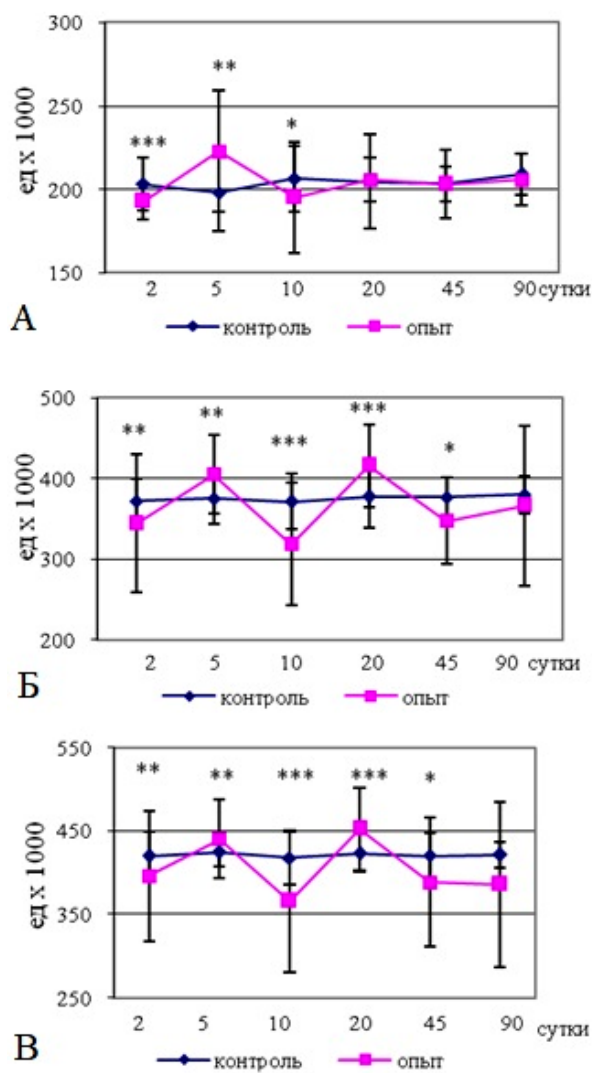


Рис. 3. Иммунореактивность нейроглобина во II (А), III (Б) и V (В) слоях лобной коры головного мозга у контрольных животных и в различные сроки холестаза (ед.×10³) (Me±IQR); * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

содержания нейроглобина на 12.4, 8.0 и 3.7% – во II, III и V слоях, соответственно, в сравнении с контролем (рис. 3А–В). В теменной коре во II и V слоях коры также было отмечено увеличение содержания нейроглобина на 14.2% и 8.4%, соответственно в сравнении с контролем (рис. 4А, В).

Через 10 сут после перевязки общего желчного протока (ПОЖП) содержание нейроглобина снижалось во II слое нейронов лобной коры на 5.5%, в III слое – на 14.1%, а в V слое – на 12.4% в сравнении с контролем (рис. 3 А–В). В теменной коре в III и V слоях также происходило снижение содержания нейроглобина на 7.1% и 5.9%, соответственно, в сравнении с контролем (рис. 4Б, В).

После 20-суточного холестаза в III слое нейронов лобной коры содержание нейроглобина увеличилось на 10.0% (рис. 1Б, 1Д), в V слое – на 7.0% (рис. 2Б, 2Д), в сравнении с контролем (рис. 3Б, В). В теменной коре в III и V слоях происходило увеличение содержания

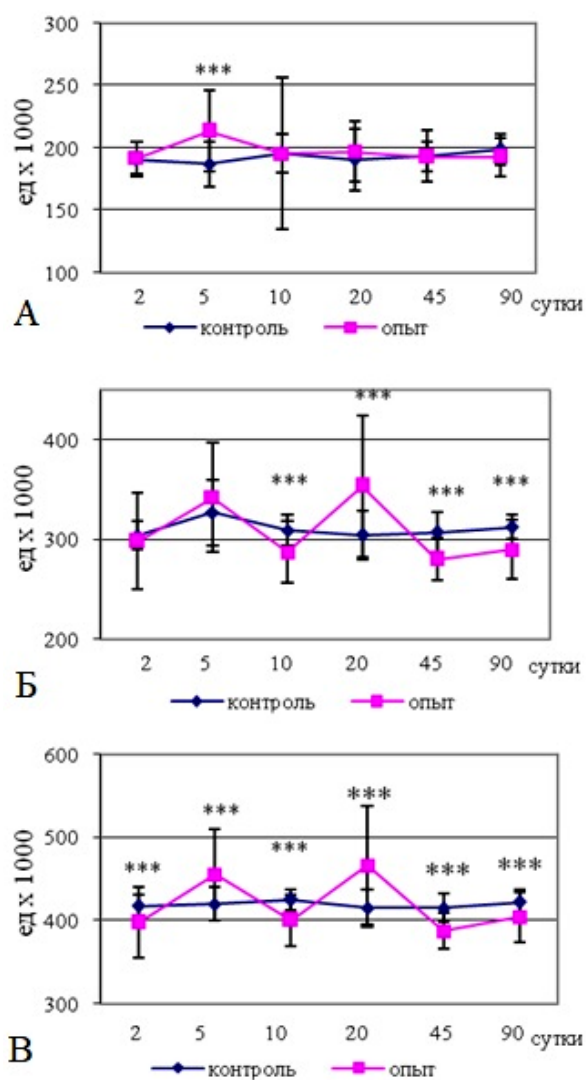


Рис. 4. Иммунореактивность нейроглобина во II (А), III (Б) и V (В) слоях теменной коры головного мозга у контрольных животных и в различные сроки холестаза (ед.×10³) (Me±IQR); *** – $p < 0.001$ по сравнению с контролем

на 16.1% и 12.4%, соответственно, в сравнении с контролем (рис. 4Б, В).

В лобной коре через 45 сут после ПОЖП в III слое нейронов содержание нейроглобина при холестазе снижалось на 7.7% (рис. 1Б, 1Е) в V слое нейронов – на 7.6% (рис. 2Б, 2Е) в сравнении с контролем (рис. 3Б, В). В теменной коре в III и V слоях происходило снижение содержания на 8.8% и 6.7%, соответственно, в сравнении с контролем (рис. 4Б, В).

Через 90 сут после ПОЖП только в теменной коре в III и V слоях сохранялось снижение содержания нейроглобина на 7.1% и 4.3%, соответственно, в сравнении с контролем (рис. 4Б, В).

В результате нашего исследования установлено, что содержание нейроглобина в нейронах коры мозга после перевязки общего желчного протока изменяется волнообразно. Так, в нейронах лобной коры на 2-, 10-, 45-е сут происходило уменьшение, а на 5-е и 20-е сут – увеличение содержания нейроглобина.

Похожие изменения наблюдались и в нейронах теменной коры, где в отличие от лобной коры, уменьшение содержания нейрогоглобина продолжалось еще и на 90-е сут после ПОЖП. Различия в содержании нейрогоглобина в нейронах лобной и теменной коры можно объяснить как разной степенью холестаза, так и неодинаковой чувствительностью различных типов нейронов и отделов коры. Это согласуется с данными других авторов о том, что содержание нейрогоглобина зависит от участка мозга и характера патологического воздействия [6]. При этом содержание нейрогоглобина в цитоплазме нейронов может зависеть как от интенсивности экспрессии, так и деградации этого белка.

Как известно, высокие энергетические потребности нейронов зависят от состояния митохондрий. Повреждение этих органелл играет ключевую роль в нарушении функций и гибели нейронов при острых и хронических заболеваниях ЦНС, нейродегенерации [7, 10]. В наших предыдущих исследованиях показано, что первые нарушения среди органелл клеток Пуркиньи мозжечка при экспериментальном холестазе у крыс наблюдаются именно в митохондриях – разрушение их мембран, крист, набухание матрикса, снижение активности маркерных ферментов [2]. Поэтому мы полагаем, что одной из причин нейродегенерации и гибели нейронов при холестазе является раннее повреждение митохондрий. Возможно, эти нарушения в митохондриях нейронов связаны с ранним (на 2-е сут после ПОЖП) уменьшением содержания кислород-запасяющего и транспортирующего белка нейрогоглобина [5].

К 5-м сут после ПОЖП явления гипоксии и окислительного стресса в нейронах мозга нарастают. В этих условиях временное увеличение содержания нейрогоглобина в нейронах коры мозга можно рассматривать как адаптационное изменение, а снижение его на 10-е сут – как срыв адаптации в условиях нарастающего холестаза, сопровождающегося гибелью нейронов. Повторное повышение содержания нейрогоглобина на 20-е сут после ПОЖП можно рассматривать как вторую волну приспособительных изменений в сохранившихся нейронах у выживших животных. Это согласуется с данными других исследователей, показавших, что накопление белка нейрогоглобина происходит именно в отдаленные сроки ишемии мозга [14]. Это предполагает участие нейрогоглобина в нейропротекции, направленной на повышение резистентности нейронов к гипоксии и окислительному стрессу [9].

В отдаленные сроки (45–90 сут) после ПОЖП у выживших животных в результате реканализации, разрастания обходных желчевыводящих путей, происходит нормализация морфофункциональных показателей в

нейронах коры и в частности, структуре и маркерных ферментах митохондрий [1], с которыми связан нейрогоглобин [12]. Возможно, с этим связано снижение и последующая нормализация содержания в них нейрогоглобина.

Через 45–90 сут после перевязки ОЖП восстановление структуры печени [1] сопровождается нормализацией морфофункциональных показателей в нейронах.

Таким образом, повреждение митохондрий (что мы ранее показали в наших исследованиях) [1–3] приводит к нарушению энергетического обмена, с чем может быть связано изменение количества нейрогоглобина в нейронах в различные сроки холестаза. Попытка компенсации нарушений сопровождается волнообразным изменением содержания в нейронах данного белка.

Заключение

Холестаз приводит к волнообразному изменению содержания нейрогоглобина в перикарионах нейронов лобной и теменной коры головного мозга белых крыс. Содержание нейрогоглобина значительно снижалось через 2, 10, 45 и 90 сут после перевязки общего желчного протока (в лобной коре – минимум через 10 сут, в теменной – через 90 сут), но повышалось через 5 и 20 сут эксперимента (максимум – 20-е сут). Возможно, в клинических условиях наблюдаемые отклонения в поведении пациентов с патологией гепатобилиарной системы, проявления у них неврологических симптомов, могут быть связаны в том числе и с изменением содержания в нейронах кислородтранспортного белка нейрогоглобина.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Мозг при холестазе. Гродно: ГрГУ; 2011 [Yemelyanchik SV, Zimatkin SM. Mozg pri kholestaze. Grodno: GrGU; 2011] (in Russian).
2. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркиньи мозжечка крыс при холестазе. Морфология. 2013; 143(2):19–23 [Yemelyanchik SV, Zimatkin SM. Structural and histochemical changes in the rat cerebellum purkinje cells after cholestasis. Morfologiya. 2013; 143(2):19–23] (in Russian).
3. Зиматкин С.М., Барабан О.В., Емельянчик С.В. Метаболические изменения в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике подпеченочного холестаза. Морфология. 2007;132(4):27–30 [Zimatkin SM, Baraban OV, Yemelyanchik SV. Metabolic changes in rat brain histaminergic neurons in dynamics of subhepatic cholestasis. Morfologiya. 2007;132(4):27–30] (in Russian).

4. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В., и др. Иммуногистохимическое исследование головного мозга. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2016 [Korzhevskii DE, Gilerovich EG, Kirik OV, et al. Immunogistokhimicheskoe issledovanie golovnogogo mozga. Saint-Petersburg: SpetsLit; 2016] (in Russian).
5. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000 Sep;407(6803):520–3. doi: 10.1038/35035093.
6. da Conceição RR, de Souza JS, de Oliveira KC, de Barros Maciel RM, Romano MA, Romano RM, et al. Anatomical specificity of the brain in the modulation of Neuroglobin and Cytochrome genes after chronic bisphenol A exposure. *Metabolic Brain Disease*. 2017 Jul 18;32(6):1843–51. doi: 10.1007/s11011-017-0066-5.
7. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009 Jul;10(7):481–94. doi: 10.1038/nrn2665
8. Guo Y, Yuan H, Jiang L, Yang J, Zeng T, Xie K, et al. Involvement of decreased neuroglobin protein level in cognitive dysfunction induced by 1-bromopropane in rats. *Brain Research*. 2015 Mar;1600:1–16. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.046
9. Li RC, Guo SZ, Lee SK, Gozal D. Neuroglobin Protects Neurons against Oxidative Stress in Global Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010 Jun 23;30(11):1874–82. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90
10. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct;443(7113):787–95. doi: 10.1038/nature05292
11. Melgarejo-Gutiérrez M, Acosta-Peña E, Venebra-Muñoz A, Escobar C, Santiago-García J, García-García F. Sleep deprivation reduces neuroglobin immunoreactivity in the rat brain. *NeuroReport*. 2013 Feb;24(3):120–5. doi: 10.1097/WNR.0b013e32835d4b74
12. Oda S, Toyoshima Y, de Bono M. Modulation of sensory information processing by a neuroglobin in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 May 23;114(23):E4658–65. doi: 10.1073/pnas.1614596114
13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press; 2007.
14. Ren C, Wang P, Wang B, Li N, Li W, Zhang C, et al. Limb remote ischemic pre-conditioning in combination with post-conditioning reduces brain damage and promotes neuroglobin expression in the rat brain after ischemic stroke. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2015 Jun 17;33(3):369–79. doi: 10.3233/RNN-140413
15. Yang S, Xie L. Brain globins in physiology and pathology. *Medical Gas Research*. 2016;6(3):154. doi: 10.4103/2045-9912.19136

Поступила в редакцию 27.04.2019
Принята в печать 2.03.2020

Received 27.04.2019
Accepted 2.03.2020

Для цитирования: Емельянчик С.В., Карнющко О.А., Зиматкин С.М. Нейроглобин в нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при холестазе. Журнал анатомии и гистопатологии. 2020; 9(1): 24–29. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-24-29

For citation: Emel'yanchik S.V., Karnyushko O.A., Zimatkin S.M. Neuroglobin in neurons of the frontal and parietal cortex of white rats in cholestasis. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020; 9(1): 24–29. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-24-29