

ИММУНОГИСТОХИМИЯ КАЛЬБИДИНА В НЕЙРОНАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И МОЗЖЕЧКА ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ У КРЫС

ЕМЕЛЬЯНЧИК С.В.¹, КАРНЮШКО О.А.², ЗИМАТКИН С.М.²

¹Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, г. Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №1. – С. 21-29.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF CALBINDINE IN THE NEURONS OF THE CEREBRAL AND CEREBELLAR CORTEX OF RATS IN CHOLESTASIS

EMELYANCHIK S.V.¹, KARNYUSHKO O.A.², ZIMATKIN S.M.²

¹Grodno State University named after Yanka Kupala, Grodno, Republic of Belarus

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(1):21-29.

Резюме.

Цель работы – оценить иммунореактивность белка кальбиндина-D28k в нейронах коры головного мозга и мозжечка крыс после перевязки общего желчного протока (ОЖП) как модели подпечёчного холестаза.

Материал и методы. Иммуногистохимическое исследование проведено на 36 белых крысах-самцах массой 200-250 г. Иммунореактивность белка кальбиндина-D28k определяли на парафиновых срезах в нейронах теменной, фронтальной коры мозга и коре мозжечка через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток после перевязки ОЖП.

Результаты. Установлено, что в условиях нарастания холестаза, вызванного перевязкой ОЖП, у крыс постепенно возрастает иммунореактивность кальбиндина-D28k в нейронах коры мозга и мозжечка с максимумом на 10-20 сутки опыта. При устранении холестаза в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга нормализуется на 45-90 сутки после перевязки ОЖП, но остаётся умеренно повышенной в клетках Пуркинье мозжечка. Наиболее выраженные изменения иммунореактивности кальбиндина при холестазе отмечены в клетках Пуркинье мозжечка и внутренних пирамидных нейронах коры головного мозга.

Заключение. При холестазе, вызванном перевязкой ОЖП, у крыс постепенно возрастает иммунореактивность кальбиндина-D28k в нейронах коры мозга и мозжечка, а при устранении холестаза она частично нормализуется. Это свидетельствует о важной роли этого кальций-связывающего белка в процессах адаптации корковых нейронов при подпечёчном холестазе.

Ключевые слова: кальбиндин-D28k, нейроны, кора головного мозга, кора мозжечка, холестаз, крысы.

Abstract.

Objectives. To estimate immunoreactivity of the calbindine-D28k protein in the neurons of the cerebral and cerebellar cortex of rats after the ligation of the common bile duct (CBD), as a model of subhepatic cholestasis.

Material and methods. The immunohistochemical investigation was carried out on 36 white male rats weighing 200-250 g. Immunoreactivity of the calbindine-D28k protein was determined on paraffin sections in the neurons of the parietal, frontal cortex and cerebellum cortex in 2, 5, 10, 20, 45 and 90 days after the CBD ligation.

Results. It has been established that in the conditions of cholestasis increase caused by the CBD ligation, immunoreactivity of calbindine-D28k in the neurons of the rats' cerebral and cerebellar cortex grew with its maximum on the 10th-20th day of the experiment. When cholestasis is eliminated as a result of bypass bile ducts growth, immunoreactivity of calbindine in the cerebral cortex neurons becomes normal on the 45th-90th day after the CBD ligation, but it remains moderately elevated in Purkinje cells of the cerebellum. The most pronounced changes of the calbindine immunoreactivity in cholestasis have been noted in the cerebellum Purkinje cells and internal pyramidal neurons of the cerebral cortex.

Conclusions. In cholestasis caused by the CBD ligation, immunoreactivity of calbindine-D28k in the neurons of the rats'

cerebral and cerebellar cortex gradually increases and on cholestasis elimination it is partially normalized. This testifies to the important role of this calcium-binding protein in the processes of cortical neurons adaptation in subhepatic cholestasis. *Key words: calbindine-D28k, neurons, cerebral cortex, cerebellum cortex, cholestasis, rats.*

В последние десятилетия в мире отмечен рост заболеваемости печени и желчевыводящих путей, связанный с возрастающей химизацией продуктов питания и неблагоприятным действием других факторов внешней и внутренней среды. При этом нередко развивается состояние холестаза – нарушение оттока желчи из печени в 12-перстную кишку, приводящее к нарушению деятельности всех органов и систем организма, включая ЦНС [1]. При этом у пациентов и животных с холестазом развиваются значительные нервно-психические и поведенческие изменения [2, 3].

В предыдущих исследованиях мы обнаружили выраженные гистологические, гистохимические и ультраструктурные изменения в структуре нейронов коры головного мозга и мозжечка крыс при экспериментальном подпечённом холестазе, приводящие к повреждению и гибели значительной их части [1, 4, 5]. Представляет большой интерес изучение при этом молекулярных нейромаркеров, которые могут быть связаны с найденными морфофункциональными нарушениями. Одним из них может быть кальций-связывающий белок кальбиндин. Как известно, Ca^{++} является универсальным внутриклеточным посредником многих нейрогуморальных сигналов, регулятором разнообразных процессов в нейронах, включая нейротрансдукцию. При экстремальных состояниях для клетки (стрессы) внутриклеточная концентрация этого иона существенно возрастает, что может быть причиной чрезмерного возбуждения и гибели нейронов. При этом кальбиндин-D28k может связывать избыток кальция, являясь важным компонентом системы его внутриклеточного гомеостаза [6]. Кальбиндин часто используют в качестве специфического маркера идентификации клеток Пуркинье коры мозжечка [7]. Гиперэкспрессия белка кальбиндина-D28k в клетках Пуркинье коры мозжечка может играть роль в нейропротекции [8].

Поскольку данные литературы по изучению содержания вышеуказанного белка в нейронах мозга при холестазе отсутствуют, представилось весьма интересным изучить иммунореактивность кальбиндина-D28k в нейронах коры голов-

ного мозга и мозжечка при моделировании подпечённого холестаза у крыс.

Цель исследования – оценить иммунореактивность белка кальбиндина-D28k в нейронах коры головного мозга и мозжечка крыс после перевязки общего желчного протока (ОЖП) как модели подпечённого холестаза.

Материал и методы

Исследование проведено на 36 беспородных белых крысах-самцах массой 200-250 г. Опытным животным под общим эфирным наркозом перевязывали общий жёлчный проток на 3-5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Контрольной группе проводили ложную операцию, т.е. лапаротомию без перевязки ОЖП. При проведении опытов соблюдали все правила проведения работ с использованием лабораторных животных. На проведение данного исследования получено разрешение этического комитета УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 1, от 11.01.2017).

Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток после операции с 9 до 11 часов утра (для синхронизации по времени) по три опытных и контрольных животных забивали декапитацией. Для получения сопоставимых результатов кусочки коры мозга от всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C в течение 20 часов, а затем заключали в парафин. Стандартные парафиновые срезы толщиной 7 мкм (фронтальные – для коры мозга и сагиттальные – для коры мозжечка) готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Идентификацию структур проводили согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [9]. Для исследования брали участки фронтальной (от -4,2 до 1,8 мм) и теменной (от -6,84 до -8,52 мм) доли коры больших полушарий головного мозга, а также участки коры мозжечка в паравермальной области (от -10,08 до -12,72 мм).

Демаскировка антигена после фиксации не использовалась. Для иммуногистохимиче-

ского выявления кальбиндина-D28K применяли первичные поликлональные кроличьи антитела Rabbit polyclonal antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 11426) в разведении 1:1200 (выбрано как оптимальное из ряда разведений: 1:100 – 2000), при +4°C, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437). В качестве отрицательного контроля использовали препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки (они не должны окрашиваться), а положительным контролем – клетки Пуркинье мозжечка, известные своей высокой иммунореактивностью к кальбиндину.

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (BitFlow, США).

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10,0 для Windows. Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-test).

Результаты

Иммуногистохимические препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой, а также мозговые оболочки во всех препаратах не окрашивались.

Кора головного мозга

Во втором слое лобной и теменной коры головного мозга большинство нейронов умеренно иммунопозитивны по кальбиндину. Продукты иммуногистохимической реакции в виде мелких темно-коричневых гранул распределены по всему перикариону и в начальных участках отростков, преимущественно дендритов (рис. 1А, 2А). В третьем, пятом и шестом слоях коры видны единичные нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина (по количеству они состав-

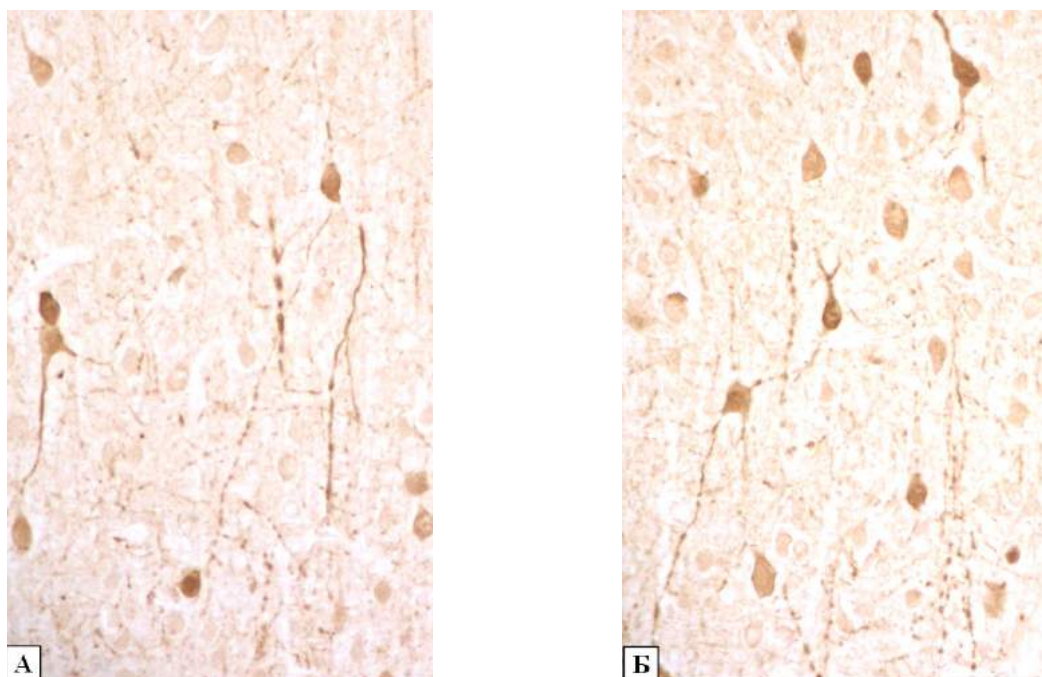


Рисунок 1 – Экспрессия кальбиндина в нейронах третьего - пятого слоев фронтальной коры мозга крыс в контроле – А (10 суток после ложной операции) и увеличение количества иммунопозитивных нейронов в опыте – Б (10 суток холестаза). Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин-D28K.

Ув. 200. Цифровая микрофотография.

ляют менее 1% от общего числа нейронов, выявляемых по Нисслию). Встречаются также нейроны с умеренной и низкой иммунореактивностью, но большинство нейронов в этих слоях иммунонегативны. Многие нервные волокна окрашиваются

прерывисто, «чёткообразно» (рис. 1А).

В лобной коре головного мозга на вторые сутки после перевязки ОЖП в некоторых препаратах определены группы иммунопозитивных клеток в виде колонок, идущих от второго до

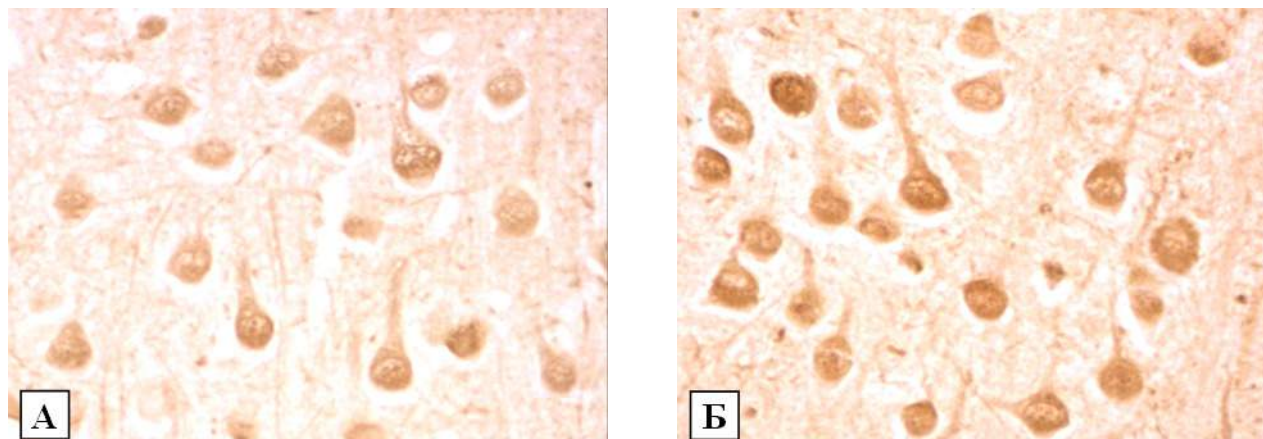


Рисунок 2 – Иммунореактивность кальбиндина в нейронах второго слоя теменной коры мозга крыс в контроле – А (20 суток после ложной операции) и увеличение её в опыте – Б (20 суток холестаза).

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин - D28K. Ув. 400. Цифровая микрофотография.

Таблица 1 – Количество кальбиндин-позитивных нейронов во фронтальной и теменной коре головного мозга контрольных крыс и в разные сроки после перевязки ОЖП (штук в 1 мм²) (Me±IQR)

Слой коры	Фронтальная		Теменная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2 суток				
третий	6,50±0,50	7,70±0,90*↑	7,50±0,60	8,50±0,40*↑
пятый	6,10±0,0	7,20±0,90*↑	7,10±0,50	8,60±0,20*↑
шестой	3,10±0,30	4,40±1,10*↑	3,40±0,30	3,40±0,50*↑
5 суток				
третий	6,40±0,10	9,0±1,20*↑	7,40±0,70	9,90±0,60*↑
пятый	6,10±0,70	7,50±0,60*↑	7,0±0,80	8,70±0,30*↑
шестой	3,20±0,40	3,80±0,50*↑	3,30±0,20	4,0±0,20*↑
10 суток				
третий	6,30±0,20	8,90±1,40*↑	7,60±0,10	10,50±0,60*↑
пятый	6,50±0,50	10,60±0,90*↑	6,90±0,30	11,30±0,50*↑
шестой	3,20±0,70	4,90±0,20*↑	3,3±0,30	5,70±0,30*↑
20 суток				
третий	6,10±0,20	10,20±1,10*↑	7,60±0,80	12,10±0,50*↑
пятый	6,20±0,60	10,60±0,90*↑	7,20±0,50	12,70±0,30*↑
шестой	3,10±0,40	6,10±1,20*↑	3,40±0,40	6,30±0,30*↑
45 суток				
третий	6,30±0,30	6,30±0,20	7,40±0,70	7,20±0,70
пятый	6,20±0,40	6,30±0,40	7,20±0,10	7,10±0,50
шестой	3,10±0,40	3,20±0,40	3,10±0,20	3,0±0,40
90 суток				
третий	6,10±0,30	6,10±0,50	7,10±0,70	7,10±0,20
пятый	6,30±0,40	6,0±0,90	7,0±0,10	7,20±0,50
шестой	3,10±0,40	3,20±0,20	3,10±0,20	3,10±0,60

Примечание:* – p<0,05 по сравнению с контролем; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

шестого слоя коры. Подобное явление в другие сроки эксперимента не наблюдалось. При этом происходит увеличение количества нейронов с высокой иммунореактивностью в третьем слое в 1,2 раза, в пятом – в 1,2 раза, в шестом – в 1,4 раза. Однако средняя иммунореактивность кальбинина в цитоплазме перикарионов нейронов второго слоя снижена на 6,0%, а в пятом – на 6,8% (табл. 1, 2).

Пятисуточный холестаз приводит к увеличению количества высокоиммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,4 раза, в пятом – в 1,2 раза, а в шестом – в 1,2 раза. При этом отмечено увеличение экспрессии данного белка в нейронах третьего слоя коры (на 5,7%) (табл. 1, 2).

Десятисуточный холестаз вызывает увеличение количества иммунопозитивных клеток в третьем слое – в 1,4 раза, в пятом – в 1,6 раза, а в шестом – в 1,5 раза. Иммунореактивность кальбинина в нейронах второго слоя возрастает на 10,5%, в третьем – на 10,9% и в пятом – на 7,3%.

При этом если процентное соотношение нейронов с сильной, средней и слабой экспрессией в третьем слое в контроле примерно одинаковое, то в опыте нейроны с сильной активностью составляют 42,4%, средней – 28,2% и слабой – 29,4%. В пятом слое картина примерно идентичная: нейроны с сильной иммунореактивностью составляют 45,0%, со средней – 28,8% и слабой – 26,2% (рис. 1, табл. 1, 2).

Двадцатисуточный холестаз приводит к увеличению количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,7 раза, в пятом – в 1,7 раза, в шестом – в 2,0 раза. При этом иммунореактивность кальбинина во втором слое увеличена на 26,1%, в третьем – на 17,1% и в пятом – на 7,7%. При этом если процентное соотношение нейронов третьего слоя с высокой, средней и малой иммунореактивностью в контроле примерно равное, то в опыте происходит увеличение нейронов с сильной до 60,2%, средней – до 25,8% и слабой – до 14,0%. В пятом слое картина пример-

Таблица 2 – Иммунореактивность кальбинина в нейронах слоев фронтальной и теменной коры головного мозга контрольных крыс и в разные сроки холестазы (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Слой коры	Фронтальная		Теменная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2 суток				
второй	204,35 \pm 32,28	192,11 \pm 16,84***↓	227,42 \pm 17,89	218,40 \pm 18,90***↓
третий	308,97 \pm 21,72	302,84 \pm 45,94	335,53 \pm 18,27	329,65 \pm 50,62
пятый	348,73 \pm 26,20	324,96 \pm 53,63**↓	380,56 \pm 20,88	355,15 \pm 48,24***↓
5 суток				
второй	198,39 \pm 24,49	189,85 \pm 49,62	218,17 \pm 22,53	220,41 \pm 33,62
третий	292,48 \pm 48,65	309,20 \pm 39,12**↑	322,10 \pm 37,06	355,65 \pm 33,35***↑
пятый	362,64 \pm 45,46	360,14 \pm 32,84	383,48 \pm 29,28	400,26 \pm 30,84***↑
10 суток				
второй	205,02 \pm 32,19	226,48 \pm 57,97***↑	228,12 \pm 19,72	229,95 \pm 62,59
третий	303,40 \pm 33,62	336,48 \pm 41,0***↑	334,11 \pm 28,54	377,32 \pm 63,33***↑
пятый	363,20 \pm 34,62	389,55 \pm 68,83**↑	388,46 \pm 20,33	417,0 \pm 69,87*↑
20 суток				
второй	198,04 \pm 41,73	249,70 \pm 38,55***↑	222,78 \pm 26,14	240,15 \pm 61,13***↑
третий	311,26 \pm 36,65	364,62 \pm 55,56***↑	336,0 \pm 24,73	387,59 \pm 55,52***↑
пятый	354,51 \pm 41,84	381,98 \pm 65,72**↑	376,68 \pm 24,71	430,48 \pm 62,25***↑
45 суток				
второй	199,56 \pm 40,22	202,23 \pm 26,67	225,66 \pm 20,53	226,48 \pm 15,08
третий	305,95 \pm 27,92	293,85 \pm 26,25	334,16 \pm 17,92	321,45 \pm 39,39
пятый	350,19 \pm 23,52	354,46 \pm 28,06	379,40 \pm 21,98	394,13 \pm 31,29**↑
90 суток				
второй	202,32 \pm 28,20	203,30 \pm 19,52	230,14 \pm 15,16	228,29 \pm 18,62
третий	312,30 \pm 24,50	305,21 \pm 34,50	342,09 \pm 15,49	333,15 \pm 26,75
пятый	358,69 \pm 37,77	351,27 \pm 37,48	385,50 \pm 16,69	382,59 \pm 23,42

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ↓ – статистически значимое снижение изучаемого параметра; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

но идентична: нейроны с сильной активностью составляют 60,8%, со средней – 22,2% и слабой – 17,0% (табл. 1, 2).

Через 45 и 90 суток после перевязки ОЖП во всех слоях фронтальной коры в опыте и контроле разницы в количестве кальбиндин-иммунореактивных нейронов и интенсивности их окрашивания не определено (табл. 1, 2).

В теменной коре мозга крыс через 2 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,1 раза, а в пятом – в 1,2 раза. При этом во втором слое выявлено снижение экспрессии кальбиндина-D28k на 4,0%, а в пятом – на 6,7%. Через 5 суток после перевязки ОЖП количество иммунопозитивных нейронов в третьем слое теменной коры увеличивается в 1,3 раза, в пятом – в 1,2 раза и в шестом – в 1,2 раза. При этом в нейронах третьего слоя иммунореактивность кальбиндина увеличена на 10,4%, а в пятом слое – на 4,4% (табл. 1, 2).

Через 10 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,4 раза, в пятом – в 1,6 раза и в шестом – в 1,7 раза. При этом в третьем слое происходит увеличение иммунореактивности данного белка на 12,9% и в пятом – на 7,3%. Процентное соотношение в третьем слое нейронов с сильной, средней и слабой экспрессией в контроле примерно равное, а в опыте с сильной иммунореактивностью – до 44,4%, средней – до 30,2% и слабой – до 25,4%. В пятом слое аналогичные изменения: с сильной активностью – до 47,0%, со средней – до 30,8% и слабой – до 22,2% (табл. 1, 2).

Через 20 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,6 раза, в пятом – в 1,8 раза, в шестом – в 1,9 раза. При этом во втором слое отмечено увеличение иммунореактивности кальбиндина на 7,8% (рис. 2), в третьем – на 15,4% и пятом – на 14,3%. Если в контроле процентное соотношение нейронов в третьем и пятом слое с сильной, средней и слабой иммунореактивностью примерно равное, то в опыте происходит увеличение нейронов с сильной иммунореактивностью до 62,2%, со средней – до 25,8% и слабой – до 12,0%. В пятом слое картина примерно идентичная: с сильной активностью – до 65,8%, со средней – до 20,2% и слабой – до 14,0% (табл. 1, 2).

Спустя 45 и 90 суток после перевязки ОЖП количество кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в контроле и опыте не различается, а иммунореактивность кальбиндина достоверно повышена только на 45 сутки в нейронах пятого слоя (на 3,9%) (табл. 1, 2).

Кора мозжечка

Результаты иммуногистохимического исследования кальбиндина в коре мозжечка в контроле показали высокое содержание этого белка в перикарионах клеток Пуркинье и их дендритах, интенсивно ветвящихся в молекулярном слое (рис. 3А). В телах клеток Пуркинье определены мелкие гранулы коричневого цвета, относительно равномерно распределенные по цитоплазме. Внутри ядер видны более крупные гранулы, напоминающие глыбки хроматина. В зернистом

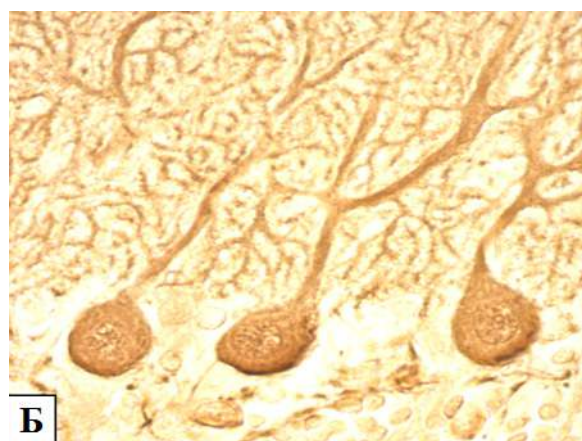
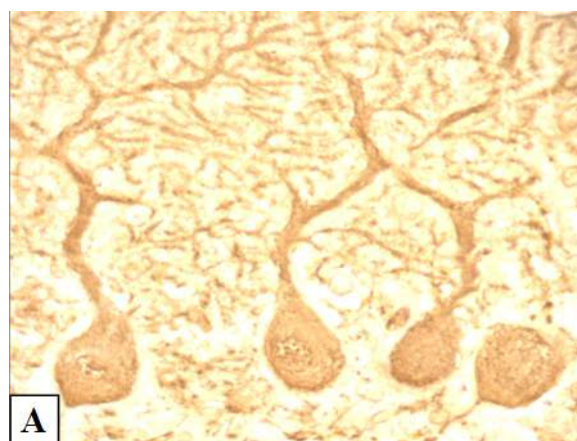


Рисунок 3 – Экспрессия белка кальбиндина в коре мозжечка крыс в контроле – А (20 суток после ложной операции) и ее увеличение в опыте – Б (20 суток холестаза). Видны иммунопозитивные перикарионы клеток Пуркинье. Иммуногистохимическая реакция на белок кальбиндин - D28K.

Ув. 400. Цифровая микрофотография.

Таблица 3 – Иммунореактивность кальбиндина в перикарионах клеток Пуркинье мозжечка контрольных крыс и в разные сроки после перевязки общего жёлчного протока (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль	Опыт
2	307,47 \pm 39,05	256,0 \pm 46,54***↓
5	298,47 \pm 28,73	292,69 \pm 39,28
10	295,05 \pm 39,35	376,0 \pm 82,38***↑
20	299,72 \pm 42,32	362,09 \pm 22,78***↑
45	298,88 \pm 39,45	338,12 \pm 21,86***↑
90	290,72 \pm 43,47	326,24 \pm 9,47***↑

Примечание:*** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ↓ – статистически значимое снижение изучаемого параметра. ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

слое коры мозжечка выявляются умеренно окрашенные клетки-зёрна и моховидные волокна.

Через двое суток после перевязки ОЖП в перикарионах клеток Пуркинье экспрессия белка кальбиндина снижается на 16,7%, а через 5 суток она не отличается от контрольных значений (табл. 3).

Через 10 суток после перевязки ОЖП в перикарионах клеток Пуркинье экспрессия кальбиндина увеличивается на 27,4%, а через 20 дней – на 20,8% (рис. 3, табл. 3).

Через 45 и 90 суток после перевязки ОЖП иммунореактивность кальбиндина в клетках Пуркинье остаётся повышенной на 12,2% и 8,2% соответственно (табл. 3).

Обсуждение

В наших предыдущих исследованиях установлено, что после перевязки ОЖП у крыс постепенно развивается холестаза с максимумом его проявлений на 10-20 сутки опыта, что сопровождается глубокими структурными и гистохимическими нарушениями в нейронах коры мозга и мозжечка и гибелью до 14% нейронов и 60% животных [1, 4, 5]. Затем, на 45-90 сутки опыта, у выживших животных и в сохранившихся нейронах все выявленные нарушения постепенно нормализуются. Это объясняется разрастанием обходных желчевыводящих путей, восстановлением оттока желчи в 12-перстную кишку и устранением холестазы [5, 10].

В условиях нарастающего холестазы количество кальбиндин-иммунореактивных нейронов во фронтальной и теменной коре мозга постепенно увеличивается: на 10-20% на вторые сутки после перевязки ОЖП и на 70-100% на 20-е сутки. Интересно, что после нее средняя иммунореактивность кальбиндина в нейронах в динамике

холестазы меняется волнообразно: сначала, через двое суток после перевязки ОЖП, в нейронах коры мозга и мозжечка снижается, затем постепенно возрастает с максимумом на 10-20 сутки, позднее (через 45 и 90 суток) частично нормализуется параллельно со всеми другими структурными и гистохимическими параметрами. Какую же роль играет кальций-связывающий и депонирующий белок кальбиндин в этих реактивных и адаптационных изменениях корковых нейронов?

При экстремальных состояниях для клетки (стресс) внутриклеточная концентрация этого иона существенно возрастает, что может быть причиной чрезмерного возбуждения и гибели нейронов. Безусловно, холестаза является таким экстремальным состоянием и мощным метаболическим стрессом для всего организма и нейронов мозга. При этом триггером его, вероятно, является резкое повышение в крови билирубина (с максимумом на 5-е сутки после перевязки ОЖП) и токсических жёлчных кислот [1]. Пока не показано, но весьма вероятно и повышение при холестазе содержания кальция в нейронах мозга. Вероятно, это и сопровождается повышением экспрессии кальбиндина в нейронах с максимумом на 10-20 сутки, в период наиболее тяжёлых структурных и гистохимических нарушений в корковых нейронах мозга. Известно, что кальбиндин-D28k может связывать избыток кальция, являясь важным компонентом системы внутриклеточного гомеостаза этого иона [6], в том числе и в условиях эксайтотоксичности, вызванной возбуждающим медиатором глутаматом [11]. Известно, что гиперэкспрессия белка кальбиндина-D28k в клетках Пуркинье коры мозжечка может играть роль в нейропротекции [8]. Поэтому вполне возможно, что кальбиндин таким образом предохраняет нейроны мозга от гибели в условиях холестазы. Можно предполагать,

что в коре мозга и мозжечка крыс при холестазе выживают именно нейроны с повышенной экспрессией кальбиндина. Интересно, что в клетках Пуркинье мозжечка повышенная иммунореактивность кальбиндина сохраняется даже в отдалённые сроки после устранения холестаза, когда большинство структурных и метаболических параметров полностью нормализуется. Возможно, эта долгосрочная гиперэкспрессия кальбиндина обеспечит повышенную выживаемость нейронов в условиях возможного повторного холестаза.

Интересно, что нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина по количеству, размерам и форме очень напоминают гиперхромные нейроны коры мозга и мозжечка, количество которых при холестазе также значительно возрастает [1, 5]. В этих нейронах увеличено количество свободных рибосом, синтезирующим белок для собственных нужд клетки, что обеспечивает адаптацию к неблагоприятным условиям и выживание нейронов [12]. Одним из интенсивно синтезируемых белков и может быть кальбиндин.

Заключение

1. В условиях нарастания холестаза, вызванного перевязкой общего жёлчного протока у крыс, иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка постепенно возрастает с максимумом на 10-20 сутки опыта.

2. При устранении холестаза в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга нормализуется, но остаётся несколько повышенной в клетках Пуркинье коры мозжечка.

3. Более выраженные изменения иммунореактивности кальбиндина при холестазе отмечены в клетках Пуркинье коры мозжечка и внутренних пирамидных нейронах коры головного мозга.

4. Выявленные изменения иммунореактивности кальбиндина-D28k свидетельствуют о важной роли этого кальций-связывающего белка

в процессах адаптации корковых нейронов при холестазе.

Литература

1. Емельянчик, С. В. Мозг при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин. – Гродно : ГрГУ, 2011. – 268 с.
2. Ганиткевич, Я. В. Влияние задержки и потерь желчи на аналитико-синтетическую деятельность коры головного мозга / Я. В. Ганиткевич // Журн. высшей нерв. деятельности им. И. П. Павлова. – 1959. – Т. 9, № 5. – С. 690–700.
3. Behavioral alterations and fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats / L. Le Sueur-Maluf [et al.] // An Acad. Bras. Cienc. – 2015 Mar. – Vol. 87, N 1. – P. 331–493.
4. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинье мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 2. – С. 19–23.
5. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах фронтальной коры мозга крысы при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2018. – Т. 133, № 1. – С. 7–12.
6. Platinum drugs and neurotoxicity: effects on intracellular calcium homeostasis / V. M. Piccolini [et al.] // Cell Biol. Toxicol. – 2013 Oct. – Vol. 29, N 5. – P. 339–353.
7. Downregulation of Purkinje cell activity by modulators of small conductance calcium-activated potassium channels in rat cerebellum / T. V. Karelina [et al.] // Acta Naturae. – 2016 Oct-Dec. – Vol. 8, N 4. – P. 91–99.
8. Single course of antenatal betamethasone produces delayed changes in morphology and calbindin-D28k expression in a rat's cerebellar Purkinje cells / R. Pascual [et al.] // Acta Neurobiol. Exp. (Wars). – 2014. – Vol. 74, N 4. – P. 415–423.
9. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.
10. Емельянчик, С. В. К моделированию подпеченочного холестаза у крыс / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 56–61.
11. Slemmer, J. E. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death / J. E. Slemmer, C. I. De Zeeuw, J. T. Weber // Prog. Brain Res. – 2005. – Vol. 148. – P. 367–390.
12. Зиматкин, С. М. Темные нейроны мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2017. – Т. 156, № 6. – С. 81–86.

Поступила 03.10.2018 г.

Принята в печать 28.01.2019 г.

References

1. Emel'yanchik SV, Zimatkin SM. The brain in cholestasis. Grodno, RB: GrGU, 2011. 268 p. (In Russ.)
2. Ganitkevich YaV. Influence of bile latency and bile loss on the analytic and synthetic activity of the cerebral

cortex. Zhurn Vysshei Nerv Deiatel'nosti im IP Pavlova. 1959;9(5):690-700. (In Russ.)

3. Le Sueur-Maluf L, Viana MB, Nagaoka MR, Amorim AL, Cardoso AN, Rodrigues BC1, et al. Behavioral alterations and fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats. An Acad Bras Cienc. 2015

- Mar;87(1):331-493. doi: 10.1590/0001-3765201420130262
4. Emel'yanchik SV, Zimatkin SM. Structural and histochemical changes in Purkinje cells of rat cerebellum in cholestasis. *Morfologiya*. 2013;143(2):19-23. (In Russ.)
5. Emel'yanchik SV, Zimatkin SM. Structural and histochemical changes in the neurons of the frontal cortex of the rat brain in cholestasis. *Morfologiya*. 2018;133(1):7-12. (In Russ.)
6. Piccolini VM, Bottone MG, Bottiroli G, De Pascali SA, Fanizzi FP, Bernocchi G. Platinum drugs and neurotoxicity: effects on intracellular calcium homeostasis. *Cell Biol Toxicol*. 2013 Oct;29(5):339-53. doi: 10.1007/s10565-013-9252-3
7. Karelina TV, Stepanenko YD, Abushik PA, Sibarov DA, Antonov SM. Downregulation of Purkinje cell activity by modulators of small conductance calcium-activated potassium channels in rat cerebellum. *Acta Naturae*. 2016 Oct-Dec;8(4):91-99.
8. Pascual R, Valencia M, Larrea S, Bustamante C. Single course of antenatal betamethasone produces delayed changes in morphology and calbindin-D28k expression in a rat's cerebellar Purkinje cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2014;74(4):415-23.
9. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 448 p.
10. Emel'yanchik SV, Zimatkin SM. To the modeling of hepatic cholestasis in rats. *Novosti Med-Biol Nauk*. 2018;17(2):56-61. (In Russ.)
11. Slemmer JE, De Zeeuw CI, Weber JT. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death. *Prog Brain Res*. 2005;148:367-90. doi: 10.1016/S0079-6123(04)48029-7
12. Zimatkin SM, Bon' EI. Dark brain neurons. *Morfologiya*. 2017;156(6):81-6. (In Russ.)

Submitted 03.10.2018

Accepted 28.01.2019

Сведения об авторах:

Емельянчик С.В. – к.м.н., доцент кафедры зоологии и физиологии человека и животных, Гродненский государственный университет им. Я.Купалы;

Карнюшко О.А. – к.б.н., ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет;

Зиматкин С.М. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Emelyanchik S.V. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Zoology & Human and Animal Physiology, Grodno State University named after Yanka Kupala;

Karnyushko O.A. – Candidate of Biological Sciences, lecturer of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Grodno State Medical University;

Zimatkin S. M. – Doctor of Biological Sciences, professor, head of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Grodno State Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, Гродненский государственный медицинский университет, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии. E-mail: karnyushko-olga@mail.ru – Карнюшко Ольга Анатольевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 230009, Grodno, 80, Gorky str., Grodno State Medical University, Chair of Histology, Cytology & Embryology. E-mail: karnyushko-olga@mail.ru – Olga A. Karnyushko.