

10. Клиническое значение непарной передней мозговой артерии / П. Г. Шнякин, А. В. Протопопов, А. В. Ботов [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2023. – Т. 16, № 5. – С. 103–108.

ЭКСПРЕССИЯ C-FOS В НЕЙРОНАХ ГРУШЕВИДНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

Климуть Т.В., Заерко А.В., Дудко Р.А., Скоробогатый Д.И., Климуть Д.В.
*Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь*

Введение. Холестаз – тяжёлое осложнение заболеваний печени и желчевыводящих путей, приводящее к нарушению оттока желчи, расстройствам пищеварения и поступлению её компонентов в кровь и мозг. Это состояние встречается более чем у 10% населения и может вызывать структурные и функциональные нарушения головного мозга. Грушевидная кора, относящаяся к древней коре, играет ключевую роль в обработке обонятельной информации и тесно связана с лимбическими структурами, регулирующими эмоции, память и висцеральные реакции. Благодаря этим связям она является важным элементом нейровисцеральной интеграции.

Патологические состояния, сопровождающиеся системным воспалением, метаболическими нарушениями и изменениями состава крови, такие как холестаз, могут вызывать функциональную и морфологическую перестройку грушевидной коры. Было показано, что холестаз приводит к структурным повреждениям и гибели нейронов в этой области [1, с. 602]. В связи с этим представляет интерес изучение молекулярно-генетических механизмов данных нарушений, в частности роли белка c-fos – продукта гена быстрого реагирования, экспрессия которого быстро усиливается в нейронах в ответ на различные стимулы и отражает их функциональную активность [2, с. 689].

Цель. Установить участие белка c-fos в механизмах адаптации нейронов грушевидной коры к холестазу.

Методы исследования. Всего в исследовании участвовало 220 самцов беспородных белых крыс с массой тела 225 ± 25 грамм. 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. Суммарная летальность при моделировании холестаза составила 67,2%, при этом пик смертности приходился на 3–25-е сутки эксперимента, после 30 суток случаев гибели не регистрировалось. Для дальнейших исследований были взяты 72 выжившие особи, распределённые по 6 животных в 6 опытных и 6 контрольных группах. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Работа выполнена в соответствии с требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 [3, с. 5]. На проведение данного исследования получено разрешение Комитета

по биомедицинской этике]. На проведение данного исследования получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол №1 от 11.01.2024 г.).

На 2, 5, 10, 20, 45 и 90 сутки после операции, в утренние часы, опытных и контрольных животных выводили из эксперимента путем декапитации. Предварительно животных анестезировали парами эфира. Для дальнейшего исследования брали фрагменты больших полушарий головного мозга. Фиксацию образцов проводили в цинк-этанол-формальдегиде [4, с. 8] при температуре +4°C в течение ночи. После фиксации образцы заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica Microsystems, Германия) и монтировали на предметные стекла.

Гистологические срезы обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии [5, с. 45]. Для выявления экспрессии белка C-fos использовали первичные поликлональные кроличьи антитела Anti-C-fos antibody (Abcam, Великобритания, кат. № ab. 209794). Оптимальное рабочее разведение антител составило 1:1000. Инкубацию проводили при +4°C в течение 20 часов во влажной камере. Для детекции связанных первичных антител применяли набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam, Великобритания, кат. № ab. 80436).

Идентификацию областей грушевидной коры крысы осуществляли с использованием схем стереотаксического атласа [6, с. 112]. Гистологические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью светового микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems, Германия) и программного обеспечения для анализа изображений Image Warp (Bit Flow, США).

Морфометрические исследования позволили получить количественные непрерывные данные. Их статистическую обработку проводили с использованием лицензионной программы Statistica 10.0 для Windows. Применяли методы описательной статистики. Поскольку выборки не всегда имели нормальное распределение, для анализа использовалась непараметрическая статистика. Для каждого показателя рассчитывали медиану (Me), нижний квартиль (LQ), верхний квартиль (UQ) и интерквартильный диапазон (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test), так как объекты исследования набирались в группы независимо друг от друга. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [7, с. 312].

Результаты и их обсуждение. Во втором слое грушевидной коры контрольных животных c-fos-иммунореактивность выявлялась в цитоплазме нейронов с различной интенсивностью окраски, что позволило разделить клетки на слабо- и сильно-позитивные. При холестазе уже на 2-е сутки отмечалось максимальное увеличение числа сильно иммунопозитивных нейронов – в 1,6 раза по сравнению с контролем. Повышенный уровень

сохранялся на 5–10-е сутки, а к 20-м суткам снижался, отражая ослабление стресс-ответа. На 45-е и 90-е сутки, когда происходило формирование обходных желчных протоков и устранение холестаза, показатели возвращались к контрольным значениям, что указывает на обратимость активации c-fos и её зависимость от патологического стимула. В третьем слое грушевидной коры достоверных изменений экспрессии c-fos на всех сроках не выявлено, что подчёркивает слоеспецифичность ответа и более высокую устойчивость глубоких нейронов. Такая избирательная активация согласуется с данными о большей чувствительности пирамидных нейронов второго слоя к системным стрессорам и метаболическим нарушениям, а также с наличием на границе II–III слоёв нейрональных клеток-предшественниц, повышающих адаптационный потенциал более глубоких нейронов третьего слоя грушевидной коры.

Выводы. Таким образом, c-fos является чувствительным индикатором адаптационных изменений нейронов грушевидной коры головного мозга при холестазе, а выявленные различия подчеркивают слоевую специфичность реакции нейронов на эту патологию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Устойчивость нейронов грушевидной коры мозга к холестазу / Т. В. Климуть, А. В. Заерко, С. В. Емельянчик [и др.] // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2025. – Т. 23, № 6. – С. 601–609.
2. Current opinion on the use of c-Fos in neuroscience / S. Y. Lara Aparicio, Á. J. Laureani Fierro, G. E. Aranda Abreu [et al.] // NeuroSci. – 2022. – Vol. 3, № 4. – P. 687–702.
3. 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 // Official Journal of the European Union. – 2010. – № 63. – P. 1–47.
4. Григорьев, И. П. Современные технологии фиксации биологического материала, применяемые при проведении иммуногистохимических исследований (обзор) / И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10, № 2. – С. 6–16.
5. Коржевский, Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии : руководство / Д. Э. Коржевский О. В. Кирик, М. Н. Карпенко [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. – 2-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. – 119 с.
6. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.
7. Омельченко, В. П. Информатика, медицинская информатика, статистика / В. П. Омельченко, А. А. Демидова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 608 с.