

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.1+616.831-005.4:616-092.9

doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.204-215

СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Е.В. Узлова, С.М. Зиматкин, Е.И. Бонь

*Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно,
230009, Республика Беларусь*

Аннотация

Нейроглобин (Ngb) является представителем семейства глобинов и обеспечивает кислородный гомеостаз клеток мозга. Известны особенности распределения Ngb в норме, но не при церебральной ишемии, исследования которой проводятся преимущественно на трансгенных организмах, а данные о содержании Ngb представлены для малого числа структур мозга. Это обуславливает необходимость систематического сравнительного анализа изменения содержания Ngb в структурах мозга крысы при субтотальной церебральной ишемии различной длительности. На основании результатов иммуногистохимического исследования содержания Ngb в 25 структурах мозга взрослых белых крыс-самцов линии Вистар после 30-минутной и 3-часовой субтотальной церебральной ишемии выявлено его снижение в большинстве структур, особенно через 3 ч после воздействия, в частности в филогенетически более старых структурах.

Ключевые слова: нейроглобин, ишемия, нейроны, головной мозг, крыса

Введение

Нейроглобин (Ngb) – это металлопротеин семейства глобинов, экспрессирующийся в нервной системе, сетчатке глаза, а также некоторых эндокринных органах. Предполагается, что Ngb участвует в обеспечении кислородного гомеостаза клеток («депо кислорода»), подавляет окислительный стресс, блокирует митохондриальные факторы апоптоза, связывает свободные радикалы, защищает митохондрии от воздействия монооксида азота (NO), регулирует клеточную NO-сигнализацию, а также способствует регенерации аксонов во время реперфузии через активацию сигнального пути p38-MAPK [1].

Ранее нами была проведена количественная иммуногистохимическая оценка содержания Ngb в нейронах различных структур мозга крысы, что позволило установить закономерности и особенности его регионального и клеточного распределения в норме [2]. Поскольку нейроглобин предположительно выполняет нейропротекторную роль, представляет интерес изучение изменения содержания Ngb при патологических состояниях, в частности при ишемии головного мозга, являющейся одной из наиболее частых причин инвалидизации и смерти в мире (ишемический инсульт). Несмотря на достаточно большое количество научных данных об изменении содержания и/или экспрессии Ngb при ишемии, почти все подобные исследования выполнены с использованием материала от сверхэкспрес-

сирующих Ngb культур клеток или организмов [3], что не позволяет экстраполировать данные на нормальные, нетрансгенные организмы и корректно оценить роль Ngb при церебральной ишемии.

Таким образом, актуальность настоящего исследования обусловлена отсутствием данных о динамике Ngb в нейронах различных структур мозга крысы при церебральной ишемии. Эта информация позволит в дальнейшем провести корреляцию степени ишемического повреждения нейронов структур мозга с динамикой Ngb и тем самым предоставить новую информацию к вопросу о нейропротекторном действии Ngb при ишемии.

Цель исследования – выявить закономерности изменения иммунореактивности нейроглобина в нейронах различных отделов мозга крысы при субтотальной ишемии различной длительности.

1. Материалы и методы

Исследование выполнено на 12 беспородных белых крысах-самцах (контрольная группа – $n = 4$, 30 мин субтотальной ишемии – $n = 4$, 3 ч субтотальной ишемии – $n = 4$) линии Вистар, массой 220–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария на полноценном рационе. Соблюдались все требования Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [4]. На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 15.01.2020).

Моделирование субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) проводилось путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг). Забор головного мозга крыс опытных групп осуществлялся через 30 мин и 3 ч после операции. Контрольным животным делали ложную операцию, без перевязки общих сонных артерий.

Проводили быструю декапитацию крыс, извлекали головной мозг и делили на три части фронтальными разрезами. Фиксация проводилась в цинк-этанол-формальдегиде [5] при +4°C в течение 20 ч, затем образцы обезвоживались в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили через каждые 500 мкм с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Leica Biosystems, Германия) и монтировали на заранее подготовленные стекла.

Один срез из серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [6], другой окрашивали иммуногистохимически для выявления содержания Ngb. Применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в оптимальном разведении 1:600, экспозиция 20 ч, при +4°C во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Abcam, Великобритания, ab. 236466).

В качестве положительного контроля выступали ткани с известным высоким содержанием Ngb, а в качестве отрицательного – срезы, обработанные нормальной кроличьей сывороткой вместо первичных антител.

Дополнительным внутренним отрицательным контролем служили ядра нейронов и мозговые оболочки.

Изучение препаратов, микрофотографирование и цитофотометрию в структурах мозга 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 (Bit Flow, США). Изучено 25 структур мозга (отделы, области, слои коры и ядра (скопления нейронов)). Иммунореактивность Ngb выражали в единицах оптической плотности $\times 10^3$.

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США; серийный номер 31415926535897). Результаты цитофотометрии представляли в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для сравнения контрольной и опытных групп использовали непараметрический H-критерий Краскела – Уоллиса (Kruskal – Wallis H-test) ($p < 0.05$).

2. Результаты и их обсуждение

Ngb-иммунореактивность (Ngb-ИР) выявлена в цитоплазме тел нейронов и их отростков, ядра остаются неокрашенными. Ngb-ИР в контрольной группе соответствует ранее выявленным закономерностям [2].

Изменения Ngb-ИР после СИГМ обнаружены во всех исследованных отделах мозга крысы. Преимущественно отмечается снижение ИР, однако степень и скорость его отличаются (рис. 1–3, табл. 1).

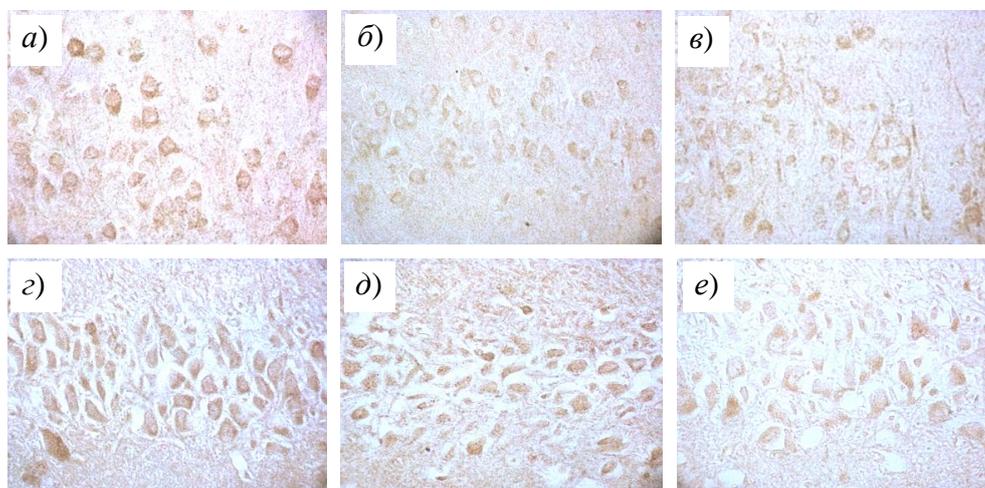


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание нейронов конечного мозга: *а–в* – II слой пириформной коры, *г–е* – пирамидный слой поля СА2 гиппокампа; *а* и *г* – контрольная группа, *б* и *д* – 30-минутная СИГМ, *в* и *е* – 3-часовая СИГМ. Увеличение 400х

В конечном мозге выделяется несколько групп структур по характеру изменения ИР Ngb при СИГМ. Для древней пириформной коры (рис. 1, *а–в*) характерно снижение ИР после 30-минутной СИГМ на 18% и повышение ИР до контрольного уровня после 3-часовой СИГМ, т. е. «волнообразное» изменение. Как исключение, в митральных клетках обонятельной луковицы, наоборот,

Ngb-ИР повышается на 16% после 30-минутной СИГМ и частично нормализуется после 3-часового воздействия (рис. 1, *а-в*, табл. 1).

В гиппокампе (в полях СА1–СА3) и зубчатой извилине снижение ИР Ngb после 30-минутной ишемии происходит на 12–21%, а после 3-часовой – на 24–35% от контрольного уровня (рис. 1, *г-е*, табл. 1), т. е. сохранения или повышения ИР не отмечается ни в одной из частей гиппокампа, что отличается от типа и скорости изменений ИР в других изученных структурах аллокортекса.

В слоях периллокортекса и неокортекса не наблюдается снижения ИР после 30-минутной СИГМ. После 3-часового воздействия ИР снижается на 19–24% в периллокортексе и на 11–33% в неокортексе. Примечательно, что в III слое ретроспленальной агранулярной коры Ngb-ИР повышается после 30-минутной СИГМ (на 26%), но уже после 3-часовой происходит резкое снижение ИР, по характеру совпадающее с изменениями в других слоях. Таким образом, структуры периллокортекса и неокортекса характеризуются более медленным снижением содержания Ngb по сравнению с филогенетически более старыми структурами конечного мозга.

В нейронах структур промежуточного мозга (рис. 2, *а-в*, табл. 1) Ngb-ИР снижается на 23–33% после 30-минутной СИГМ и продолжает снижаться после, достигая снижения на 25–42% от контрольного уровня. Менее выраженные изменения происходят в медиальном маммилярном ядре, так как ИР не снижается после 30-минутного воздействия, а после 3-часового снижается меньше, чем в других исследованных структурах (на 25%).

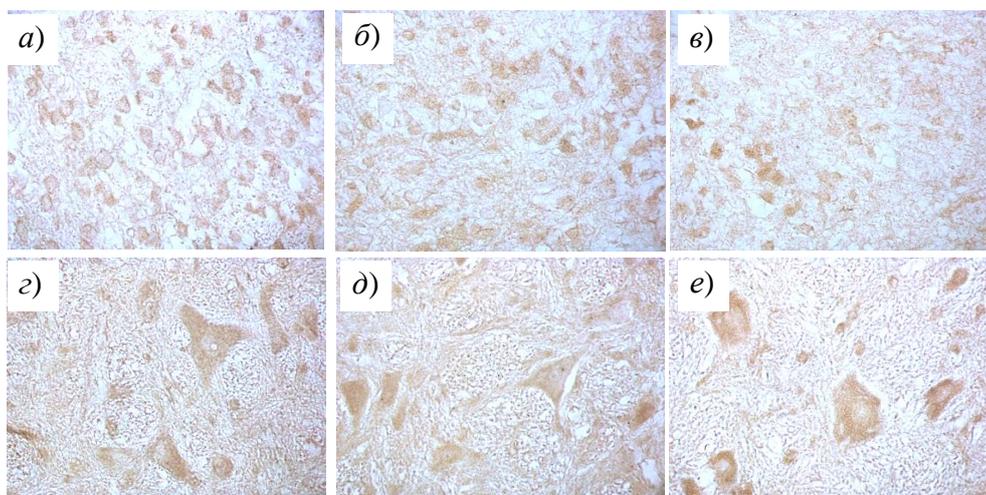


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание нейронов промежуточного и продолговатого мозга: *а-в* – медиальное габенулярное ядро, *г-е* – гигантоцеллюлярное ядро; *а* и *г* – контрольная группа, *б* и *д* – 30-минутная СИГМ, *е* и *е* – 3-часовая СИГМ. Увеличение 400х.

В среднем и продолговатом мозге в одной из исследованных структур – спинальном ядре тройничного нерва – не отмечается достоверного снижения Ngb-ИР. В вентральной области покрышки происходит даже увеличение ИР после 30-минутной СИГМ, но после 3-часового воздействия уровень ИР возвращается к контрольным значениям. В остальных же исследованных структурах среднего и продолговатого мозга (рис. 2, *г-е*, табл. 1) снижение ИР отмеча-

ется уже после 30-минутного воздействия. После 3-часовой СИГМ возможно как сохранение уровня ИР в сравнении с предыдущим сроком, так и дальнейшее снижение.

Структуры мозжечка характеризуются различной динамикой изменения иммунореактивности Ngb. Наименее значительные изменения Ngb-ИР обнаружены в клетках Пуркинье коры мозжечка. При этом в клетках Пуркинье простой долики изменений не отмечено ни после 30-минутной, ни после 3-часовой СИГМ (рис. 3, *а-в*, табл. 1). В околоклочке же происходит относительно небольшое снижение (на 7%) Ngb-ИР после 30-минутного воздействия и остается на прежнем уровне даже после 3 ч СИГМ. Разные ядра мозжечка отличаются неодинаковым снижением Ngb-ИР: во вставочном ядре происходит снижение уже после 30-минутного воздействия, без дальнейшего снижения, в то время как в латеральном ядре (рис. 3, *г-е*) достоверное снижение отмечается после более длительного воздействия. В обоих случаях снижение ИР к 3 ч СИГМ составляет 22–23% от контрольного уровня (табл. 1).

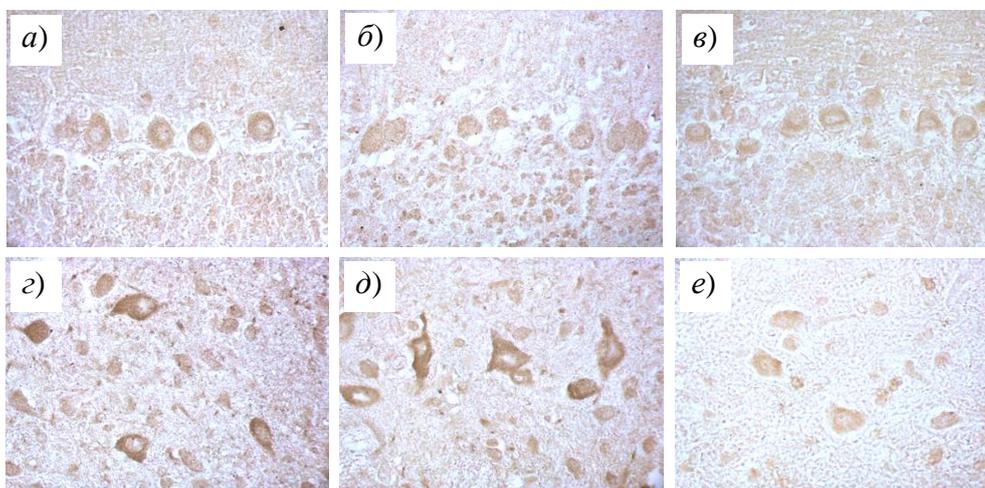


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание нейронов мозжечка: *а-в* – клетки Пуркинье простой долики коры, *г-е* – нейроны латерального ядра; *а* и *г* – контрольная группа, *б* и *д* – 30-минутная СИГМ, *в* и *е* – 3-часовая СИГМ. Увеличение 400х.

Таким образом, при субтотальной церебральной ишемии содержание Ngb в нейронах большинства отделов мозга значительно снижается, что свидетельствует об общей неустойчивости кислородного депо большинства нейронов мозга к ишемическому воздействию. Структуры без изменения Ngb (спинальное ядро тройничного нерва, клетки Пуркинье простой долики мозжечка) составляют малую долю в мозге. В отдельных типах нейронов (митральные клетки, вентральная область покрышки) через 30 мин после начала ишемии происходит даже временное увеличение содержания нейроглобина, с последующей нормализацией через 3 ч.

Обнаруженные изменения позволяют говорить и о разной устойчивости кислородного депо в структурах мозга в зависимости от филогенетического возраста: более молодые периаллокортекс, неокортекс и кору мозжечка можно выделить как структуры с более устойчивым кислородным депо, так как 30-

минутная СИГМ не приводит к снижению в них Ngb-ИР, в то время как в аллокортексе, стволе мозга и ядрах мозжечка кислородное депо уже уменьшается.

Табл. 1
Изменения иммунореактивности Ngb в нейронах мозга крысы ($\times 10^3$ ед. опт. плотности)

Структура	Содержание Ngb (Me (LQ; UQ))		
	Контрольная группа	30-минутная СИГМ	3-часовая СИГМ
1	2	3	4
Конечный мозг			
Митральные клетки	156.7 (138.9; 174.3)	181.0 (170.1; 196.3) * $p = 0.002$	173.4 (147.9; 187.8) * $p = 0.467$ ** $p = 0.141$
Пириформная кора	185.2 (172.0; 197.0)	151.2 (140.3; 166.9) * $p = 0.000$	184.7 (159.2; 206.2) * $p = 0.583$ ** $p = 0.003$
Гиппокамп СА1, пирамидный слой	209.2 (190.4; 226.9)	164.8 (154.8; 196.1) * $p = 0.000$	130.9 (111.5; 154.9) * $p = 0.000$ ** $p = 0.001$
Гиппокамп СА2, пирамидный слой	231.3 (217.9; 247.3)	204.8 (174.7; 221.1) * $p = 0.001$	174.8 (156.7; 183.2) * $p = 0.000$ ** $p = 0.006$
Гиппокамп СА3, пирамидный слой	219.7 (193.2; 243.0)	177.5 (166.1; 198.2) * $p = 0.004$	120.9 (109.3; 148.8) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$
Зубчатая извилина, зернистый слой	186.6 (167.1; 213.8)	163.9 (149.8; 176.0) * $p = 0.003$	130.8 (120.3; 138.3) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$
Ретроспленальная агранулярная кора III	226.3 (210.9; 244.2)	285.8 (251.8; 323.2) * $p = 0.000$	183.2 (173.9; 211.9) * $p = 0.003$ ** $p = 0.000$
Ретроспленальная агранулярная кора V	240.4 (198.8; 259.2)	222.3 (197.9; 243.0) * $p = 0.520$	195.8 (175.4; 214.4) * $p = 0.000$ ** $p = 0.031$
Ретроспленальная агранулярная кора VI	244.6 (232.2; 260.7)	240.2 (219.2; 255.1) * $p = 0.344$	185.8 (175.0; 208.0) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$
Височная кора III	164.7 (153.1; 180.5)	165.5 (134.3; 206.8) * $p = 0.998$	146.3 (118.5; 158.6) * $p = 0.003$ ** $p = 0.009$
Височная кора V	179.4 (156.1; 191.3)	182.0 (150.4; 207.9) * $p = 0.983$	144.7 (118.5; 152.8) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$
Височная кора VI	167.6 (151.3; 185.2)	174.7 (156.2; 200.2) * $p = 0.999$	111.6 (99.0; 124.2) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$
Промежуточный мозг			
Ядра задней группы таламуса	229.9 (204.7; 243.3)	174.1 (160.7; 201.6) * $p = 0.000$	135.1 (128.3; 153.3) * $p = 0.000$ ** $p = 0.000$

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
Медиальное маммилярное ядро	217.6 (196.2; 232.3)	204.8 (190.9; 224.8) * <i>p</i> = 0.825	163.0 (147.5; 178.1) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.000
Медиальное габенулярное ядро	250.2 (226.7; 266.8)	168.6 (152.6; 180.3) * <i>p</i> = 0.000	144.1 (130.0; 157.5) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.011
Гистаминергическое ядро E2	305.0 (277.7; 317.0)	235.7 (218.2; 247.6) * <i>p</i> = 0.000	199.5 (176.3; 217.0) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.002
Средний и продолговатый мозг			
Вентральная область покрышки	211.7 (188.5; 235.4)	237.6 (188.0; 269.4) * <i>p</i> = 0.089	211.1 (194.9; 235.9) * <i>p</i> = 0.985 ** <i>p</i> = 0.196
Компактное вещество черной субстанции	230.4 (210.0; 246.3)	170.9 (151.2; 184.3) * <i>p</i> = 0.000	141.4 (133.9; 151.3) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.002
Латеральная ретикулярная область	291.0 (278.8; 310.4)	198.6 (168.1; 217.7) * <i>p</i> = 0.000	201.8 (179.3; 218.4) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 1.000
Спинальное ядро тройничного нерва	202.3 (177.2; 216.7)	190.7 (164.4; 227.8) * <i>p</i> = 1.000	189.9 (170.2; 208.7) * <i>p</i> = 0.885 ** <i>p</i> = 1.000
Гигантоцеллюлярное ядро	237.0 (215.5; 264.7)	183.9 (170.3; 194.1) * <i>p</i> = 0.000	191.6 (180.8; 208.7) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.684
Мозжечок			
Клетки Пуркинье простой долики	159.7 (147.6; 168.2)	155.3 (122.4; 169.4) * <i>p</i> = 0.807	157.3 (146.7; 189.6) * <i>p</i> = 1.000 ** <i>p</i> = 0.415
Клетки Пуркинье окологлочка	171.0 (144.8; 183.7)	163.5 (135.6; 156.5) * <i>p</i> = 0.027	160.2 (134.3; 165.8) * <i>p</i> = 0.057 ** <i>p</i> = 1.000
Латеральное ядро	247.4 (190.3; 272.5)	214.0 (201.9; 224.1) * <i>p</i> = 0.683	189.0 (174.5; 202.2) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 0.003
Вставочное ядро	292.0 (268.3; 300.6)	224.3 (186.0; 241.4) * <i>p</i> = 0.000	226.0 (205.2; 237.8) * <i>p</i> = 0.000 ** <i>p</i> = 1.000

Примечание: * – *p* относительно контроля, ** – *p* относительно 30-минутной СИГМ

Меньшая чувствительность кислородного депо филогенетически молодых структур при ишемии ранее отмечалась в научной литературе [7], однако факторы, определяющие данное различие, до сих пор не обозначены. Причиной таких различий, вероятнее всего, является более ранняя активация нейропротекторной функции нейроглобина в нейронах гиппокампа вследствие существенно более высокого уровня нейрональной синтазы оксида азота (nNOS)

при кислород-глюкозной депривации в сравнении с нейронами коры [8]. Несмотря на то, что более высокий уровень nNOS описывался для развивающихся нейронов [8], нельзя исключать возможность существования аналогичных различий в уровнях nNOS и среди нейронов взрослых организмов.

Известно, что после 1-часовой СИГМ происходит 29%-ное снижение Ngb в гиппокампе (поле CA1) [9], что соответствует нашим данным о 21%-ном и 37%-ном снижении Ngb после 30-минутного и 3-часового воздействия соответственно.

Также известно о 32%-ном снижении ИР Ngb в пирамидных нейронах V слоя париетальной коры после 1-часовой СИГМ [9], в то время как в височной коре после 30-минутной СИГМ значимые изменения отсутствовали, а после 3-часовой они составили только 19%. Подобные результаты указывают на разную по скорости и степени реакцию кислородного депо разных участков неокортекса на ишемическое воздействие.

Неустойчивость кислородного депо зависит от длительности ишемического воздействия. После 3-часовой ишемии содержание Ngb в нейронах большинства структур снижается более значительно, чем после 30-минутной, т. е. нейроны не могут поддерживать кислородное депо на прежнем уровне.

Важно отметить отсутствие случаев увеличения Ngb относительно контрольного уровня после 3-часовой СИГМ, что согласуется с данными других исследований об экспрессии Ngb в нервных клетках с нормальной экспрессией данного белка [10]. Как известно из научных данных, увеличение экспрессии Ngb при ишемии или гипоксии наблюдалось у Ngb-сверхэкспрессирующих животных или в отдельных культурах клеток [11–17], но не в нетрансгенных организмах.

Мы полагаем, что гетерогенность результатов при сравнении структур передней (конечный и частично промежуточный мозг) и задней части мозга (средний мозг, мост и продолговатый мозг) при ишемии, вызванной перевязкой общих сонных артерий, в значительной степени обусловлена различной сохранностью кровоснабжения, а внутри отделов мозга – преимущественно свойствами изученных популяций нейронов, в частности связанными с их различным филогенетическим возрастом.

Заключение

Скорость и степень изменения содержания Ngb в нейронах различных структур мозга крысы при церебральной ишемии отличаются. В большинстве исследованных структур происходит его уменьшение, особенно при длительной ишемии. Также выявлено небольшое количество структур, чье кислородное депо не изменяется.

Минимальная скорость уменьшения содержания Ngb отмечается в филогенетически более молодых структурах коры конечного мозга и коре мозжечка по сравнению с нейронами более старых структур ствола мозга.

В отдельных структурах 30-минутное ишемическое воздействие может приводить к повышению количества Ngb в нейронах, но в ответ на длительное, 3-часовое ишемическое воздействие оно всегда снижается.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № М21М-054 от 01.07.2021 «Оценка энергетического потенциала и депо кислорода нейронов мозга для прогнозирования их чувствительности к ишемии»).

Литература

1. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейроглобин: строение, функции, локализация в мозге в норме и при патологии // *Новости мед.-биол. наук.* 2019. Т. 19, № 1. С. 91–96.
2. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейроглобин в нейронах мозга крысы // *Сиб. науч. мед. ж.* 2021. Т. 41, № 4. С. 30–39. doi: 10.18699/SSMJ20210404.
3. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейропротекторное действие нейроглобина при гипоксии/ишемии // *Сиб. науч. мед. ж.* 2021. Т. 41, № 2. С. 33–39. doi: 10.18699/SSMJ20210205.
4. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>, свободный.
5. Коржевский Д.Э. Иммуногистохимическое исследование головного мозга. СПб.: СпецЛит, 2017. 143 с.
6. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. London: Acad. Press, 2007. 456 p.
7. Shang A., Zhou D., Wang L., Gao Y., Fan M., Wang X., Zhou R., Zhang C. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults // *Brain Res.* 2006. V. 1078, No 1. P. 219–226. doi: 10.1016/j.brainres.2006.01.064.
8. Jiang X., Mu D., Manabat C., Koshy A.A., Christen S., Täuber M.G., Vexler Z.S., Ferriero D.M. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation // *Exp. Neurol.* 2004. V. 190, No 1. P. 224–232. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.07.010.
9. Bon L.I., Maksymovich N.Ye., Karnyushko O.A., Zimatkin S.M., Burak I.N., Lazarev V.F. Changes in the content of neuroglobin in the neurons of the cerebral cortex of rats with ischemia // *J. Cytol. Histol. Res.* 2022. V. 1, No 1. P. 1–5. doi: 10.47363/JCHR/2022(1)101.
10. Schmidt-Kastner R., Haberkamp M., Schmitz C., Hankeln T., Burmester T. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture // *Brain Res.* 2006. V. 1103, No 1. P. 173–180. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.047.
11. Sun Y., Jin K., Mao X.O., Zhu Y., Greenberg D.A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. V. 98, No 26. P. 15306–15311. doi: 10.1073/pnas.251466698.
12. Sun Y., Jin K., Peel A., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. V. 100, No 6. P. 3497–3500. doi: 10.1073/pnas.0637726100.
13. Khan A.A., Wang Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Miles E., Graboski J., Chen S., Ellerby L.M., Jin K., Greenberg D.A. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103, No 47. P. 17944–17948. doi: 10.1073/pnas.0607497103.
14. Wang X., Liu J., Zhu H., Tejima E., Tsuji K., Murata Y., Atochin D.N., Huang P.L., Zhang C., Lo E.H. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-

- term outcomes after focal cerebral ischemia // *Stroke*. 2008. V. 39, No 6. P. 1869–1874. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.506022.
15. *Li R.C., Guo S.Z., Lee S.K., Gozal D.* Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010. V. 30, No 11. P. 1874 -- 1882. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90.
16. *Raida Z., Hundahl C.A., Nyengaard J.R., Hay-Schmidt A.* Neuroglobin over expressing mice: Expression pattern and effect on brain ischemic infarct size // *PLoS ONE*. 2013. V. 8, No 10. art. e76565. doi: 10.1371/journal.pone.0076565.
17. *Taylor J.M., Kelley B., Gregory E.J., Berman N.E.J.* Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury // *Neurosci. Lett.* 2014. V. 577. P. 125–129. doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.012.

Поступила в редакцию 15.06.2022

Принята к публикации 18.07.2022

Узлова Елизавета Валентиновна – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии

Гродненский государственный медицинский университет
г. Гродно, 230009, ул. Горького, 80
E-mail: uzlovaliza@gmail.com

Зиматкин Сергей Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии

Гродненский государственный медицинский университет
г. Гродно, 230009, ул. Горького, 80
E-mail: smzimatkin@mail.ru

Бонь Елизавета Игоревна – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии имени Д.А. Маслакова

Гродненский государственный медицинский университет
г. Гродно, 230009, ул. Горького, 80
E-mail: asphodela@list.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2023, vol. 165, no. 2, pp. 204–215

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.204-215

Neuroglobin Content in Rat Brain Structures after Subtotal Cerebral Ischemia

*E.V. Uzlova**, *S.M. Zimatkin****, *E.I. Bon****

Grodno State Medical University, Grodno, 230009 Republic of Belarus

E-mail: *uzlovaliza@gmail.com, **smzimatkin@mail.ru, ***asphodela@list.ru

Received June, 2022; Accepted July 18, 2022

Abstract

Neuroglobin (Ngb) is a member of the globin family. Like other globin proteins, it is involved in the maintenance of oxygen homeostasis. Ngb distribution in the normal brain is well known, but its response to pathological injury, such as cerebral ischemia, has not yet been adequately elucidated. One primary reason for this is that ischemic lesions in cerebral tissues have mostly been studied in transgenic organisms. In

addition, the available data on Ngb content are limited to a small number of brain structures. This article examines the patterns of changes in Ngb immunoreactivity in neurons from different parts of the rat brain after subtotal cerebral ischemia of varying duration. An immunohistochemical study of Ngb content in 25 brain structures of white male Wistar rats exposed to 30-min and 3-h subtotal cerebral ischemia was performed. A decrease in Ngb content in all structures (especially 3 h after the ischemia onset and in the phylogenetically older parts), temporal mediation, and dependence on the phylogenetic age were revealed. The obtained results further decipher the correlation between the changes in Ngb content and the degree of cerebral ischemic damage, which is necessary to clarify the functions of the studied protein.

Keywords: neuroglobin, ischemia, neurons, brain, rat

Acknowledgements. This study was funded by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (agreement no. M21M-054 of July 1, 2021 “Evaluation of the energy potential and oxygen depot of brain neurons to predict their sensitivity to ischemia”).

Figure Captions

Fig. 1. Immunohistochemical staining of neurons in the telencephalon: *a-c* – piriform cortex, layer II, *d-f* – hippocampus, field CA2, pyramidal layer; *a* and *d* – control group, *b* and *e* – 30-min subtotal cerebral ischemia, *c* and *f* – 3-h subtotal cerebral ischemia. Magnification 400x.

Fig. 2. Immunohistochemical staining of neurons in the diencephalon and medulla oblongata: *a-c* – medial habenular nucleus, *d-f* – gigantocellular nucleus; *a* and *d* – control group, *b* and *e* – 30-min subtotal cerebral ischemia, *c* and *f* – 3-h subtotal cerebral ischemia. Magnification 400x.

Fig. 3. Immunohistochemical staining of neurons in the cerebellum: *a-c* – Purkinje cells of the cerebellar cortex, *d-f* – neurons of the lateral nucleus; *a* and *d* – control group, *b* and *e* – 30-min subtotal cerebral ischemia, *c* and *f* – 3-h subtotal cerebral ischemia. Magnification 400x.

References

1. Uzlova E.V., Zimatkin S.M. Neuroglobin: Structure, functions, and localization in the brain in normal and pathological conditions. *Nov. Med.-Biol. Nauk*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 91–96. (In Russian)
2. Uzlova E.V., Zimatkin S.M. Neuroglobin in rat brain neurons. *Sib. Nauchn. Med. Zh.*, 2021, vol. 41, no. 4, pp. 30–39. doi: 10.18699/SSMJ20210404. (In Russian)
3. Uzlova E.V., Zimatkin S.M. Neuroprotective effect of neuroglobin in hypoxia/ischemia. *Sib. Nauchn. Med. Zh.*, 2021, vol. 41, no. 2, pp. 33–39. doi: 10.18699/SSMJ20210205. (In Russian)
4. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>.
5. Korzhevskii D.E. *Immunogistokhimicheskoe issledovanie golovnogo mozga* [An Immunohistochemical Study of the Brain]. St. Petersburg, SpetsLit, 2017. 143 p. (In Russian)
6. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. London, Acad. Press, 2007. 456 p.
7. Shang A., Zhou D., Wang L., Gao Y., Fan M., Wang X., Zhou R., Zhang C. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults. *Brain Res.*, 2006, vol. 1078, no. 1, pp. 219–226. doi: 10.1016/j.brainres.2006.01.064.
8. Jiang X., Mu D., Manabat C., Koshy A.A., Christen S., Täuber M.G., Vexler Z.S., Ferriero D.M. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. *Exp. Neurol.*, 2004, vol. 190, no. 1, pp. 224–232. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.07.010.
9. Bon L.I., Maksymovich N.Ye., Karnyushko O.A., Zimatkin S.M., Burak I.N., Lazarev V.F. Changes in the content of neuroglobin in the neurons of the cerebral cortex of rats with ischemia. *J. Cytol. Histol. Res.*, 2022, vol. 1, no. 1, pp. 1–5. doi: 10.47363/JCHR/2022(1)101.
10. Schmidt-Kastner R., Haberkamp M., Schmitz C., Hankeln T., Burmester T. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture. *Brain Res.*, 2006, vol. 1103, no. 1, pp. 173–180. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.047.

11. Sun Y., Jin K., Mao X.O., Zhu Y., Greenberg D.A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, vol. 98, no. 26, pp. 15306–15311. doi: 10.1073/pnas.251466698.
12. Sun Y., Jin K., Peel A., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, vol. 100, no. 6, pp. 3497–3500. doi: 10.1073/pnas.0637726100.
13. Khan A.A., Wang Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Miles E., Graboski J., Chen S., Ellerby L.M., Jin K., Greenberg D.A. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, vol. 103, no. 47, pp. 17944–17948. doi: 10.1073/pnas.0607497103.
14. Wang X., Liu J., Zhu H., Tejima E., Tsuji K., Murata Y., Atochin D.N., Huang P.L., Zhang C., Lo E.H. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2008, vol. 39, no. 6, pp. 1869–1874. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.506022.
15. Li R.C., Guo S.Z., Lee S.K., Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2010, vol. 30, no. 11, pp. 1874–1882. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90.
16. Raida Z., Hundahl C.A., Nyengaard J.R., Hay-Schmidt A. Neuroglobin over expressing mice: Expression pattern and effect on brain ischemic infarct size. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, art. e76565. doi: 10.1371/journal.pone.0076565.
17. Taylor J.M., Kelley B., Gregory E.J., Berman N.E.J. Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.*, 2014, vol. 577, pp. 125–129. doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.012.

Для цитирования: Узлова Е.В., Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Содержание нейроглобина в структурах головного мозга крысы при субтотальной ишемии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2023. Т. 165, кн. 2. С. 204–215. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.204-215.

For citation: Uzlova E.V., Zimatkin S.M., Bon E.I. Neuroglobin content in rat brain structures after subtotal cerebral ischemia. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2023, vol. 165, no. 2, pp. 204–215. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.204-215. (In Russian)