

C-FOS И КАЛЬБИНДИН В НЕЙРОНАХ

ПОЯСНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

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

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь



Введение. Холестаз (застой желчи) известен как тяжелое осложнение многих заболеваний печени и желчевыводящих путей. При этом происходит нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку, сопровождающееся нарушениями пищеварения (особенно липидов) и избыточным поступлением компонентов желчи (билирубин, желчные кислоты, холестерин) в кровь, а затем и в мозг. Это вызывает нарушение строения и функции головного мозга. Представляло интерес выяснение молекулярных механизмов нарушений, в частности участие белка *c-fos* и кальбиндина в механизмах адаптации нейронов поясной коры к холестазу.

Цель исследования – оценить влияние холестаза на содержание белка *c-fos* и кальбиндина в нейронах поясной коры крысы.

Материал и методы. Объектом исследования являлись нейроны мелкоклеточного и крупноклеточного слоев переднего отдела поясной коры мозга крыс на 2, 5, 10, 20, 45 и 90-е сутки после перевязки/перерезки у них общего желчного протока (ОЖП) или ложной операции (контроль). Использовали гистологический, иммуногистохимический, морфометрический, статистический методы.

Результаты. Увеличение количества нейронов с высокой иммунореактивностью *c-fos* наблюдается уже на ранних сроках холестаза, достигая максимума к 5-м суткам и сохраняясь значительно повышенным на 10–20-е сутки (пик холестаза), а затем постепенно снижается при устранении холестаза. Содержание кальбиндина в нейронах обоих слоев поясной коры мозга крысы значительно возрастает на 10-е и 20-е сутки, затем снижается на 45-е сутки. В отдаленные сроки на 90-е сутки содержание *c-fos* и кальбиндина в нейронах поясной коры нормализуется (не отличается от контроля).

Заключение. При холестазе возрастает число нейронов мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры крыс с повышенной иммунореактивностью белка *c-fos* и кальбиндина.

Ключевые слова: холестаз, поясная кора крысы, нейроны, *c-fos*, кальбиндин

C-FOS AND CALBINDIN IN CINGULATE CORTEX NEURONS OF THE RAT BRAIN IN CHOLESTASIS

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

¹Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

²Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Background. Cholestasis (bile stagnation) is known as a severe complication of many diseases of the liver and biliary tract. It occurs when the flow of bile from the liver into the duodenum is impaired resulting in digestive disorders (especially those of lipid metabolism) and accumulation of bile components (bilirubin, bile acids, cholesterol) in blood and then in the brain, the latter inducing the disturbances in the brain structure and functions. It was of interest to clarify the molecular mechanisms of the disorders, in particular the roles of *c-fos* protein and calbindin in the adaptation mechanisms of cingulate cortex neurons to cholestasis.

Objective. To evaluate the effect of cholestasis on the content of *c-fos* protein and calbindin in neurons of the rat cingulate cortex.

Material and methods. The object of the study were neurons of the small-cell and large-cell layers of the anterior cingulate cortex of the rat brain on days 2, 5, 10, 20, 45 and 90 after ligation/transection of the common bile duct (CBD) or sham surgery (a control group). Histological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods were used.

Results. An increase in the number of neurons with high *c-fos* immunoreactivity is observed even at early stages of cholestasis, reaching its maximum by the 5th day and remaining significantly elevated on the 10th-20th days (the peak of cholestasis), the number gradually decreasing with the elimination of cholestasis. The content of calbindin in neurons of both cingulate cortex layers of the rat brain increases significantly on the 10th and 20th days, then decreases on the 45th day. On the 90th day, the contents of *c-fos* and calbindin in neurons of the cingulate cortex normalize (do not differ from that of control).

Conclusion. Cholestasis is marked by the growth in the number of neurons with increased immunoreactivity of *c-fos* protein and calbindin in the small-cell and large-cell layers of the rat cingulate cortex.

Keywords: cholestasis, rat cingulate cortex, neurons, *c-fos*, calbindin

Автор, ответственный за переписку

Климуть Татьяна Викторовна, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: klimuts@yandex.ru

Corresponding author:

Klimut Tatyana V., Grodno State Medical University, e-mail: klimuts@yandex.ru

Для цитирования: C-fos и кальбиндин в нейронах поясной коры мозга крысы при холестазе / Т. В. Климуть, А. В. Заерко, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Гепатология и гастроэнтерология. 2025. Т. 9, № 2. С. 128-134. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2025-9-2-128-134>

For citation: Klimuts TV, Zaerko AV, Emelyanchik SV, Zimatkin SM. C-fos and calbindin in the cingulate cortex neurons of the rat brain at cholestasis. Hepatology and Gastroenterology. 2025;9(2):128-134. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2025-9-2-128-134>

Введение

Холестаз (застой желчи) известен как тяжелое осложнение многих заболеваний печени и желчевыводящих путей. При этом происходит нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку, сопровождающееся нарушениями пищеварения (особенно липидов) и избыточным поступлением компонентов желчи (билирубин, желчные кислоты, холестерин) в кровь, а затем и в мозг. Данной патологией страдает более 10% населения планеты [1]. При этом могут нарушаться строение и функции головного мозга [2]. Когнитивные нарушения являются частым осложнением заболеваний печени у людей и животных [3]. У детей и взрослых с дисфункцией печени наблюдались нарушения коэффициента интеллекта, обучения и памяти, а также зрительно-пространственных функций. Крысы с холестазом хуже справляются с прохождением водного лабиринта Морриса, у них отмечается пассивность и нарушение памяти узнавания [4].

Известно, что в выполнении когнитивных функций принимает участие поясная кора, которая является частью лимбической системы и является переходной между филогенетически новой (неокортекс) и старой (аллокортекс) корой.

В предварительных исследованиях нами установлено, что холестаз вызывает значительные структурные нарушения и гибель нейронов поясной коры [5]. Представляло интерес выяснение молекулярно-генетических механизмов этих нарушений, в частности участие белка c-fos, кодируемого геном быстрого реагирования C-fos, который быстро экспрессируется в нейронах, в ответ на различные стимулы и отражает функциональную активность нейронов. Известно, что повышение концентрации ионов кальция, вызывает индукцию гена C-fos [6]. В связи с этим было интересно параллельно изучить при холестазе в нейронах поясной коры и кальций-связывающий белок кальбиндин, поддерживающий кальциевый гомеостаз, необходимый для нормального функционирования нейронов [7].

Цель исследования – оценить влияния холестаза на содержание белка c-fos и кальбиндина в нейронах поясной коры крысы.

Материал и методы

Дизайн исследования. Проведено экспериментальное одноцентровое проспективное

выборочное контролируемое исследование. Общее количество животных в эксперименте составило 220 самцов беспородных белых крыс массой 225 ± 25 граммов. Гибель животных от холестаза во все сроки составила 67,2%. Наибольшая смертность животных наблюдалась на 3–5-е сутки и на 21–25-е сутки после операции; после 30 суток животные не погибали. В работе использованы 72 выжившие беспородные белые крысы-самцы массой 225 ± 25 г (по 6 животных в 6 опытных и 6 контрольных группах). Животных содержали в стандартных условиях вивария Гродненского государственного медицинского университета, в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и полноценной пище. В контрольных группах проводили ложную операцию с сохранением физиологического тока желчи в двенадцатиперстную кишку на протяжении всего эксперимента. В опытных группах для моделирования подпеченочного холестаза использовали перерезку общего желчного протока (ОЖП) между двумя лигатурами на 2–3 мм ниже места слияния печеночных протоков.

Условия проведения. Исследование проводилось на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета.

Продолжительность исследования. После операции в утренние часы через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток опытных и контрольных животных синхронно выводили из эксперимента путем декапитации, предварительно усыпив парами эфира.

Описание медицинского вмешательства. 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 [8]. Выбор уровня перевязки/перерезки обусловлен тем, что перевязка выше этого уровня может не приводить к полному холестазу, а ниже него в общий желчный проток впадают многочисленные протоки поджелудочной железы, перевязка которых приводит к развитию панкреатита и быстрой гибели всех животных [9]. Животным контрольной группы проводили ложную операцию (лапаротомию с сохранением физиологического тока желчи). Тяжесть холестаза контролировали по результатам биохимического анализа крови животных

(содержание билирубина, холестерина, желчных кислот) [2].

Для исследования брали кусочки переднего отдела больших полушарий головного мозга на 2, 5, 10, 20, 45 и 90-е сутки после операции, фиксировали их в жидкости Карнуга при 4°C (на ночь), а затем обезвоживали и заключали в парафин. Фронтальные срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротома (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Срезы обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии [10].

Для выявления C-fos применяли первичные поликлональные кроличьи антитела Anti- C-fos antibody фирмы Abcam (Великобритания, каталожный номер ab. 209794) в разведении 1:1000 (выбрано как оптимальное) при +4°C, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления кальбиндина-D28K применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания, каталожный номер ab. 11426) в разведении 1:1200 (выбрано как оптимальное) при +4°C, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, каталожный номер ab. 80436).

Для идентификации поясной коры крысы использовали схемы стереотаксического атласа [11].

Методы регистрации исходов. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили с использованием микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой камеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (BitFlow США; <http://www.image warp.com/app.html>).

Этическая экспертиза. Исследование проведено в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [12]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.01.2024).

Статистический анализ. В результате морфометрических исследований получены количественные непрерывные данные. Их обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер AXAR207F394425FA-Q) с применением описательной статистики. Так как в эксперименте нами использовались малые выборки, которые не всегда имели нормальное распределение, ана-

лиз проводили методами непараметрической статистики. Для каждого показателя определяли значения медианы (Me), нижнего (LQ) и верхнего (UQ) квартилей, а также интерквартильного диапазона (IQR). Объекты исследования набирали в группы независимо друг от друга, поэтому сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок (Mann–Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p<0,05$, где p – критическое значение уровня значимости) [13].

Результаты и обсуждение

В нейронах мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры контрольной группы иммунореактивность белка гена быстрого реагирования c-fos визуализировалась в виде мелкой коричневой зернистости, расположенной в перикарионах нейронов. Ядра нейронов при этом иммунонегативны (рис. 1). При подсчете количества нейронов на единицу площади (1000мкм²) клетки были разделены на две группы согласно оптической плотности. Первая группа – сильно иммунопозитивные (оптическая плотность выше 0,31) вторая группа – слабо иммунопозитивные (оптическая плотность ниже 0,3).

C-fos в нейронах мелкоклеточного слоя переднего отдела поясной коры

Уже на 2-е сутки после перерезки ОЖП в мелкоклеточном слое количество c-fos-позитивных нейронов с высокой иммунореактивностью на единицу площади по сравнению с контролем возрастает в 1,9 раза. На 5-е сутки холестаза наблюдается максимальное увеличение количества c-fos сильно иммунопозитивных нейронов (в 2,5 раза). На 10-е сутки их количество увеличено в 2,2 раза (рис. 1). На 20-е сутки после перерезки ОЖП количество c-fos сильноиммунопозитивных нейронов заметно уменьшается в сравнении с предыдущими сроками, однако по-прежнему превышает контрольные значения в 1,3 раза. На 45 и 90-е сутки эксперимента опытные показатели приходят к контрольным значениям (рис. 2).

C-fos в нейронах крупноклеточного слоя переднего отдела поясной коры

Уже на ранних сроках холестаза в нейронах опытной группы крупноклеточного слоя возрастает количество нейронов с высокой иммунореактивностью (c-fos-позитивных). На 2-е и 5-е сутки в 2,0 раза, на 10-е и 20-е в 1,7 раза (рис. 3). На более поздних сроках (45-е и 90-е сутки), количество нейронов с высокой иммунореактивностью нормализуется (рис. 4).

В цитоплазме нейронов поясной коры при окраске на выявление кальбиндина продукты иммуногистохимической реакции визуализируются в виде мелких темно-коричневых глыбок,

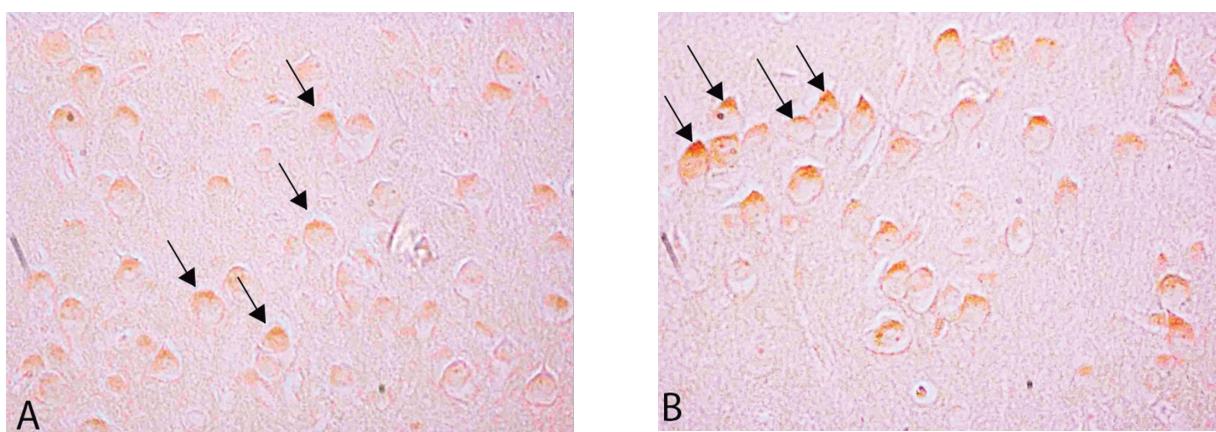
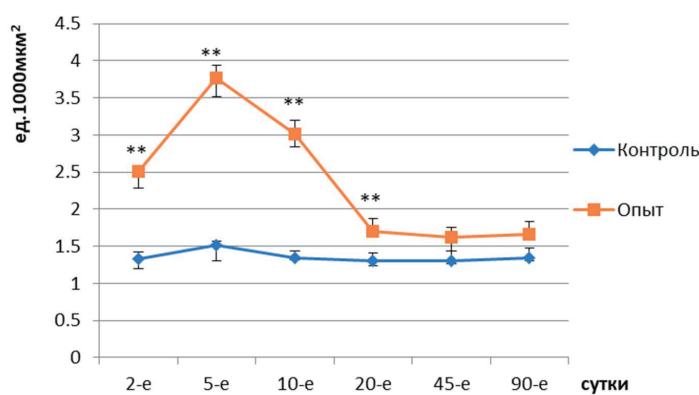


Рисунок 1 – Нейроны мелкоклеточного слоя на 10-е сутки (A – контроль, B – опыт) после перерезки ОЖП. → - c-fos-позитивные нейроны с высокой иммунореактивностью. Иммуноцитохимическая реакция на c-fos. $\times 400$
Figure 1 – Neurons of the small cell layer on the 10th day (A - control, B - experiment) after transection of the common bile duct. → - c-fos-positive neurons with high immunoreactivity. Immunocytochemical reaction to c-fos. $\times 400$



Примечание – ** – $p < 0,01$ при сравнении контролем того же срока.

Рисунок 2 – Изменения количества нейронов с высокой иммунореактивностью (c-fos-позитивных) в мелкоклеточном слое поясной коры крыс в различные сроки после перевязки общего желчного протока (опытная группа), или ложной операции (контрольная группа)
Figure 2 – Changes in the number of neurons with high immunoreactivity (c-fos-positive) in the small cell layer of the cingulate cortex of rats at different times after ligation of the common bile duct (experimental group) or sham surgery (control group)

распределенных по всему перикариону и в начальных участках отростков нейронов (рис. 5).

Кальбиндин в нейронах мелкоклеточного слоя переднего отдела поясной коры

В цитоплазме нейронов поясной коры при окраске на выявление кальбиндина продукты иммуноhistохимической реакции визуализируются в виде мелких темно-коричневых глыбок, распределенных по всему перикариону и в начальных участках отростков нейронов (рис. 5).

Содержание кальбиндина в цитоплазме нейронов мелкоклеточного слоя поясной коры в опытной группе носило волнообразный характер. Через 10 и 20 суток после перерезки ОЖП возрастало на 33% по сравнению с контролем этих же сроков (рис. 5). На 45-е сутки снижалось на 15%, а на 90-е сутки не отличалось от контроля (табл. 1; рис. 5).

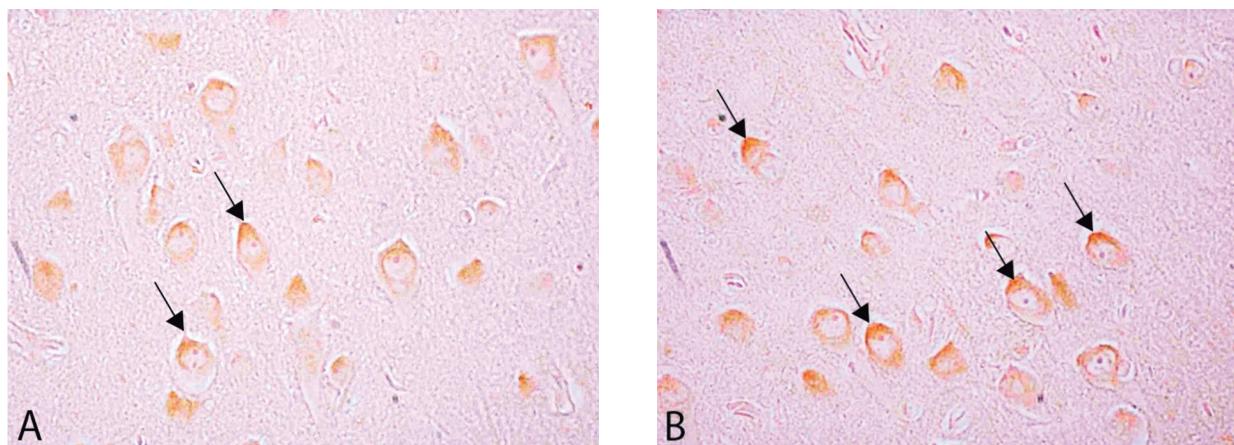
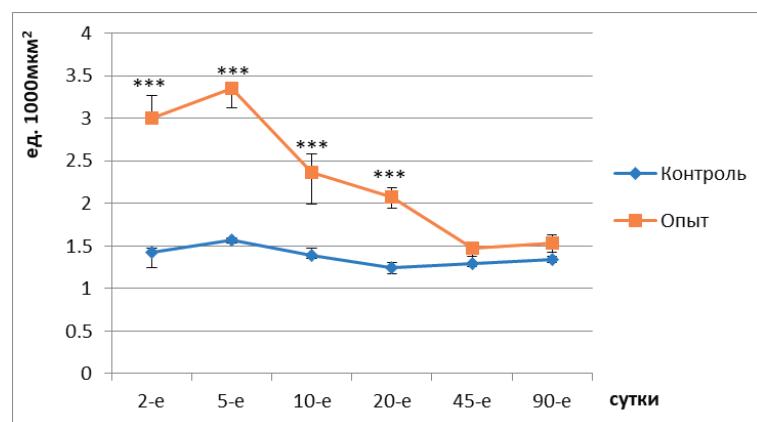


Рисунок 3 – Нейроны крупноклеточного слоя на 5-е сутки (A – контроль, B – опыт) после перерезки ОЖП. → - c-fos-позитивные нейроны с высокой иммунореактивностью. Иммуноцитохимическая реакция на c-fos. $\times 400$
Figure 3 – Neurons of the magnocellular layer on the 5th day (A - control, B - experiment) after transection of the common bile duct. → - c-fos-positive neurons with high immunoreactivity. Immunocytochemical reaction to c-fos. $\times 400$

Кальбиндин в нейронах крупноклеточного слоя переднего отдела поясной коры

Содержание кальбиндина в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры в опытной группе на 2,5 и 10-е сутки холестаза после перевязки\перерезки ОЖП достоверно не менялось. Увеличение данного показателя наблюдалось только на 20-е сутки (на 28,6%), а на 45-е и 90-е сутки данный показатель не отличается от контроля (табл. 2, рис. 6).

Таким образом, возрастание количества нейронов с высокой иммунореактивностью c-fos в мелкоклеточном и крупноклеточных слоях поясной коры мозга крыс наблюдается уже на ранних сроках холестаза, с 2-х суток, достигает максимума на 5-е сутки, а затем постепенно снижается, сохраняясь значительно повышенным на 10–20-е сутки (совпадает с пиками



Примечание – *** – $p < 0,001$ при сравнении контролем того же срока.
Рисунок 4 – Изменения количества нейронов с высокой иммунореактивностью (c-fos-позитивных) в крупноклеточном слое поясной коры крыс в различные сроки после перевязки общего желчного протока (опытная группа), или ложной операции (контрольная группа)

Figure 4 – Changes in the number of neurons with high immunoreactivity (c-fos-positive) in the magnocellular layer of the cingulate cortex of rats at different times after ligation of the common bile duct (experimental group) or sham surgery (control group)

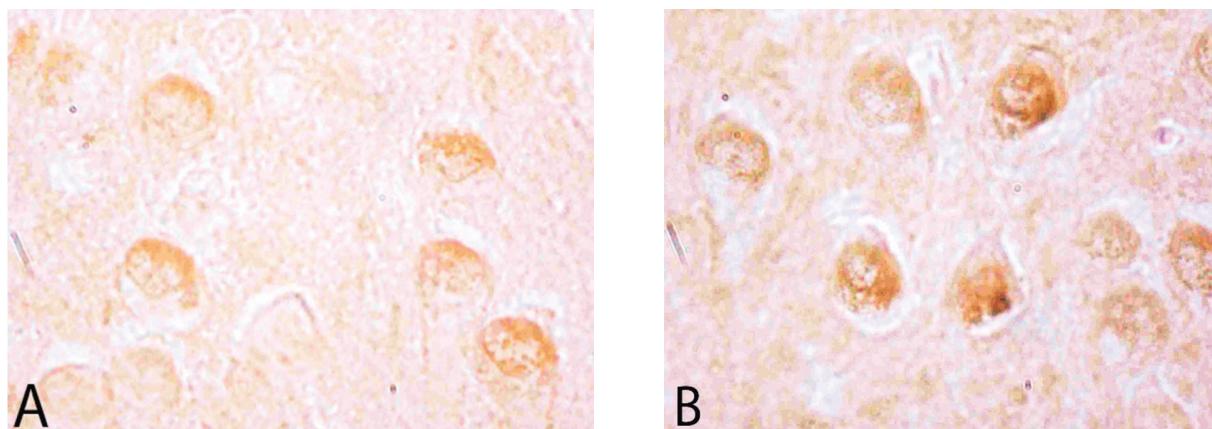


Рисунок 5 – Содержание кальбиндина в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры мозга крысы на 10-е сутки эксперимента в контрольной (A) и опытной группах (B); Иммуноцитохимическая реакция на кальбиндин, $\times 1000$
Figure 5 – Calbindin content in neurons of the small-cell layer of the cingulate cortex of the rat brain on the 10th day of the experiment in the control (A) and experimental groups (B); Immunocytochemical reaction to calbindin. $\times 1000$

Таблица 1 – Содержание кальбиндина (в ед. опт. пл.) в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры крыс в различные сроки после перевязки ОЖП (опытная группа), или ложной операции (контроль)

Table 1. Calbindin content (in units of optical density) in neurons of the small-cell layer of the cingulate cortex of rats at different times after ligation of the common bile duct (experimental group) or sham operation (control)

Сутки 24 hours	Контроль Control	Опытная группа Experience
2-е	0,26 (0,25; 0,28)	0,26 (0,24; 0,28)
5-е	0,26 (0,24; 0,27)	0,25 (0,22; 0,28)
10-е	0,27 (0,25; 0,30)	0,36 (0,34; 0,38) ***
20-е	0,27 (0,26; 0,28)	0,36 (0,33; 0,40) ***
45-е	0,27 (0,23; 0,28)	0,23 (0,22; 0,27) **
90-е	0,26 (0,23; 0,27)	0,26 (0,22; 0,28)

Примечания – Критическое значение уровня значимости (p) при сравнении показателей контрольной группы с опытной того же срока: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

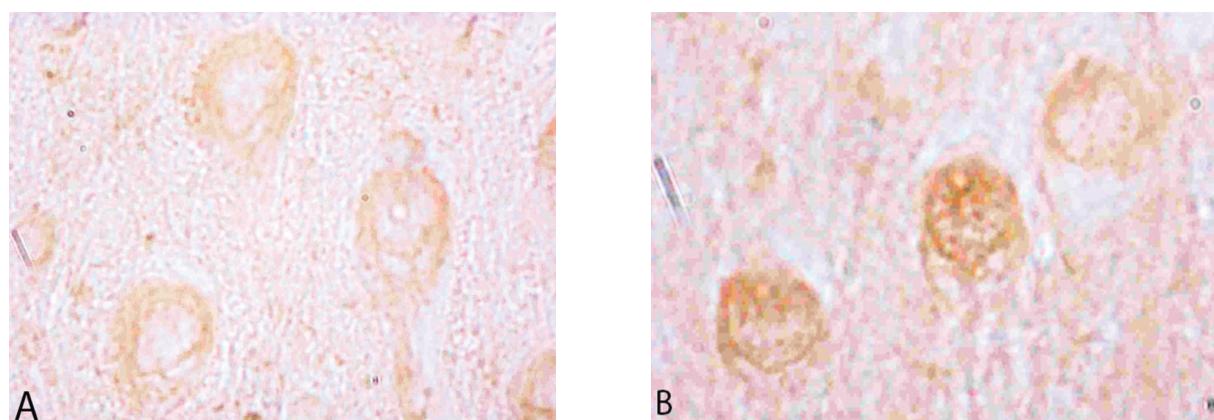


Рисунок 6 – Содержание кальбиндина в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры мозга крысы на 20-е сутки эксперимента в контрольной (A) и опытной группах (B); Иммуноцитохимическая реакция на кальбиндин, $\times 1000$
Figure 6 – Calbindin content in neurons of the magnocellular layer of the cingulate cortex of the rat brain on the 20th day of the experiment in the control (A) and experimental groups (B); Immunocytochemical reaction to calbindin. $\times 10000$

Таблица 2 – Содержание кальбиндина (в ед. опт. пл.) в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры крыс в различные сроки после перевязки ОЖП (опытная группа), или ложной операции (контроль)
Table 2 – Calbindin content (in units of optical density) in neurons of the magnocellular layer of the cingulate cortex of rats at different times after ligation of the common bile duct (experimental group) or sham operation (control)

Сутки 24 hours	Контроль Control	Опытная группа Experience
2-е	0,28 (0,26; 0,29)	0,27 (0,24; 0,28)
5-е	0,29 (0,27; 0,33)	0,29 (0,25; 0,30)
10-е	0,28 (0,26; 0,32)	0,28 (0,25; 0,31)
20-е	0,28 (0,25; 0,30)	0,36 (0,33; 0,40) ***
45-е	0,28 (0,26; 0,32)	0,29 (0,25; 0,32)
90-е	0,28 (0,26; 0,33)	0,29 (0,27; 0,31)

Примечание – Критическое значение уровня значимости (p) при сравнении показателей контрольной группы с опытной того же срока: *** – $p < 0,001$.

холестаза). В отдаленные сроки после операции количество нейронов с высокой иммунореактивностью c-fos не отличается от контрольных значений. Известно, что сверхэкспрессия c-Fos после повреждающих стимулов приводит к секреции и высвобождению факторов роста нейронов (таких как факторы регенерации аксонов) в области, окружающей травму (и некоторых отдаленных областях), что усиливает регенерацию нейронов [14]. В связи с этим, можно предположить, что наблюдаемое нами возрастание количества c-fos-позитивных нейронов связана с адаптацией нейронов к холестазу.

Содержание кальбиндина в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры мозга крысы на 2-е и 5-е сутки не отличалось от контрольных значений, но значительно возрастает на 10-е и 20-е сутки (на пике холестаза, по результатам биохимического анализа крови животных). Это может быть обусловлено деполяризацией плазмолеммы, вызванной нарушением работы ионных насосов, притоком Ca^{2+} и изменением структуры клеточной мембраны, связанных с повреждающим действием, проникших через ГЭБ, желчных кислот. Известно, что массивный

приток Ca^{2+} способствует гибели нейронов, что и наблюдалось нами на пике холестаза в обоих слоях поясной коры [15]. Экспрессия кальбиндина затем снижается на 45-е сутки.

Интересно, что нейронное истощение кальций-зависимых белков тесно связано с когнитивными нарушениями [7], что и наблюдается у пациентов при холестазе. Повышение внутриклеточного кальция может быть связано с увеличением экспрессии c-fos [6].

В отдаленные сроки на 90-е сутки содержание c-fos и кальбиндина в нейронах поясной коры нормализуется (не отличается от контроля). Это, вероятно, связано с устранением холестаза в связи с прорастанием обходных желчных протоков и восстановлением оттока желчи в двенадцатиперстную кишку [2] и отражает высокие адаптационные возможности нейронов поясной коры у крыс.

Выводы

Подпеченочный холестаз вызывает возрастание числа нейронов мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры крыс с повы-

шенной имmunoreактивностью белка c-fos уже на 2-е и особенно на 5-е сутки после перевязки/перерезки общего желчного протока. Оно остается повышенным на 10-е и 20-е сутки после операции, а затем постепенно нормализуется при устраниении холестаза. Такая динамика из-

менений указывает на участие c-fos в адаптации нейронов поясной коры к холестазу.

Содержание кальбиндина в нейронах поясной коры значительно возрастает только на 10-е и 20-е сутки после перевязки/перерезки ОЖП (на пике холестаза), а затем нормализуется или даже снижается.

References

1. Jildasheva GB. Rasprostranennost zhelchnokamennoj bolezni i sovremennoye metody lechenija [Prevalence of cholelithiasis and modern treatments]. *Re-Health Journal*. 2022;(1):42-50. (Russian)
2. Zimatkin SM, Emelyanchik SV. Nejrony mozga pri narushenijah cirkulacij zhelchi. Grodno: GrSMU; 2021. 368 p. edn: TIYPUZ. (Russian).
3. Rose CF, Amodio P, Bajaj JS, Dhiman RK, Montagnese S, Taylor-Robinson SD, Vilstrup H, Jalan R. Hepatic encephalopathy: Novel insights into classification, pathophysiology and therapy. *J Hepatol*. 2020;73(6):1526-1547. doi: 10.1016/j.jhep.2020.07.013.
4. Esfahani DE, Zarrindast MR. Cholestasis and behavioral disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2021;14(2):95-107. doi: 10.22037/ghfb.v14i2.1971.
5. Klimut TV, Zaerko AV, Emelyanchik SV, Zimatkin SM. Gistologicheskie izmenenija nejronov pojasnoj kory mozga krys pri holestaze [Histological changes in the neurons of the rat cingulate cortex during cholestasis]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences]. 2024;24(2):75-83. (Russian).
6. Lara Aparicio SY, Laureani Fierro ÁJ, Aranda Abreu GE, Toledo Cárdenas R, García Hernández LI, Coria Ávila GA, Rojas Durán F, Aguilar MEH, Manzo Denes J, Chica-Castañeda LD, Pérez Estudillo CA. Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*. 2022;3(4):687-702. doi: 10.3390/neurosci3040050.
7. Kook SY, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han SH, Son SM, Song H, Baik SH, Moon M, Yi EC, Hwang D, Mook-Jung I. Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ*. 2014;21(10):1575-87. doi: 10.1038/cdd.2014.67.
8. Kizyukevich LS. Reaktivnye izmenenija v pochkah pri eksperimentalnom holestaze. Grodno: GrGMU; 2005. 239 p. edn: NBMDLT. (Russian).
9. Kizyukevich LS. Prichiny razvitiya poliorgannoj nedostatochnosti pri hirurgicheskoy patologii zhelchevyvodjashchih putej [Reasons for the development of multiple organ failure in surgical pathology of the biliary tract]. *Vesti Nacijanaj akademii navuk Belarusi. Seryja medycynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine Series]. 2005;(2):118-121. edn: HSHAPL. (Russian).
10. Korzhevskij DJ, Kirik OV, Karpenko MN. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoje primenenije metodov immunogistochemii. 2nd ed. Sankt-Peterburg: SpecLit; 2014. 119 p. (Russian).
11. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 448 p.
12. European Parliament, Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (text with EEA relevance 20.10.2010). *Official Journal of the European Union*. 2010;63:1-47. Available from: clck.ru/3QAEfz.
13. Omelchenko VP, Demidova AA. Informatika, medicinskaia informatika, statistika. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. 608 p. (Russian).
14. Cruz-Mendoza F, Jauregui-Huerta F, Aguilar-Delgadillo A, García-Estrada J, Luquin S. Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sci*. 2022;12(6):687. doi: 10.3390/brainsci12060687.
15. Klimut TV, Zaerko AV, Emelyanchik SV, Zimatkin SM. Izmenenija hromatofili citoplazmy i soderzhanija RNK v nejronah pojasnoj kory mozga krys pri podpechjonochnom holestaze [Changes in cytoplasmic chromatophily and RNA content in neurons of the cingulate cortex of rats with subhepatic cholestasis]. *Morfologija* [Morphology]. 2024;162(1):41-53. doi: 10.17816/morph.629000. (Russian).

Вклад авторов: С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин – концепция и дизайн исследования; Т. В. Климут, А. В. Заерко – сбор и обработка материала; Т. В. Климут, А. В. Заерко, С. М. Зиматкин – написание текста; С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин – редактирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

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

Заерко Анастасия Викторовна, канд. биол. наук, доцент, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: wersall_91@mail.ru, ORCID: 0000-0001-6155-040X.

Емельянчик Сергей Владимирович, д-р биол. наук, доцент, Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, e-mail: semel@grsu.by, ORCID: 0009-0009-3032-8203.

Зиматкин Сергей Михайлович, д-р биол. наук, профессор, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: smzimatkin@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5728-2588.

Authors' contribution. S. V. Emelyanchik, S. M. Zimatkin — conceived the study and designed the experiment; T. V. Klimut, A. V. Zaerko — collected the data and performed the analysis; T. V. Klimut, A. V. Zaerko, S. M. Zimatkin — wrote the paper; S. V. Emelyanchik, S. M. Zimatkin — edited the manuscript.

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

Financing. The study was performed without external funding.

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

Information about the authors:

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

Zaerko Anastasia V., PhD (Biology), Associate Professor, Grodno State Medical University, e-mail: wersall_91@mail.ru, ORCID: 0000-0001-6155-040X.

Emelyanchik Sergey V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Yanka Kupala State University of Grodno, e-mail: semel@grsu.by, ORCID: 0009-0009-3032-8203.

Zimatkin Sergey M., PhD, MD (Biology), Professor, Grodno State Medical University, e-mail: smzimatkin@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5728-2588.

Поступила: 15.09.2025

Принята к печати: 22.10.2025

Received: 15.09.2025

Accepted: 22.10.2025