

## Імуногістохімічна ідентифікація клітин в сірій речовині спинного мозку після нанесення тупої травми

Раскалей Т.Я.<sup>\*1</sup>, Савосько С.І.<sup>1</sup>, Раскалей В.Б.<sup>1</sup>, Ковальчук О.І.<sup>2</sup>, Раскалей Д.В.<sup>1</sup>, Мохаммадіян О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Україна

<sup>2</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна

\*E-mail: t\_darmogray@ukr.net

### Ключові слова:

- травма спинного мозку
- сіра речовина
- астроцити
- нейродегенерація
- імуногістохімія

### Анотація

У даній роботі висвітлюються морфологічні аспекти перебудови сірої речовини спинного мозку після його травматизації. В умовах експерименту встановлено тенденцію розвитку дегенеративних змін та збільшення кількості клітин, які характеризуються фагоцитарною активністю, у різних топографічних ділянках спинного мозку.

## Вступ

Як до, так і після травми, різні клітини сірої речовини спинного мозку співіснують у певному співвідношенні, впливаючи одна на одну відповідно до змін внутрішнього та зовнішнього середовища. Після травми відбувається сукупність реакцій з боку різних клітин, як нервової так і сполучної тканин, спрямованих на відновлення початкового балансу [1, 2, 3]. За проявом цих реакцій стоять якісні та кількісні зміни клітинного складу сірої речовини спинного мозку [4, 5]. Наше дослідження стосується вивчення питань морфологічних змін у сірій речовині спинного мозку за умов нанесення тупої травми і є надзвичайно актуальним і перспективним для практичного використання.

**Метою дослідження** було вивчення динаміки морфологічних змін у сірій речовині спинного мозку в гострий період після нанесення тупої травми.

## Матеріал і методи

Для вивчення реактивних властивостей сірої та білої речовини спинного мозку нами був здійснений експеримент на лабораторних тваринах за розробленою методикою моделювання хребетно-спинномозкової травми. Дослідження проводилось на лабораторних щурах-самцях масою 200-250 г, які перебували на стандартному раціоні харчування віварію НМУ імені О.О. Богомольця і були розподілені на 5 груп по 10 щурів у кожній. 1 група була контрольною і слугувала для порівняння морфологічних змін з вихідними показниками. 2 група була виведена з експерименту через 1 добу, 3-я – через 4 доби, 4-та – через 7 діб і 5-та – через 14 діб. Контузійна травма спинного мозку була спричинена щурам 2, 3, 4 і 5-ї груп з використанням "Пристрою для моделювання тупої травми спинного мозку після попередньої ламінектомії під тіопенталовим наркозом". Вивченню підлягала сіра речовина передніх і задніх рогів спинного мозку у місцях пошкодження. Фрагменти поперечних зрізів спинного мозку готували згідно

загальноприйнятої методики. Потім зрізи інкубували з антитілами проти GFAP (кролячі анти-GFAP-антитіла, sc-9065, Santa Cruz Biotechnology, США; розведення в PBST 1: 200 протягом 18 год при +4°C). Результати імуофлуоресцентного забарвлення спостерігали за допомогою лазерного скануючого мікроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) та згодом обробляли програмним забезпеченням Zeiss ZEN. Зразки для подальшої світлової мікроскопії промивали згідно методики протягом 2 годин, зневоднювали в етанолі і занурювали в парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular, Німеччина). На мікротомі Thermo Microm HM 360 (Thermo Fisher Scientific Microm, Німеччина) було підготовлено зрізи спинного мозку товщиною 6 мкм. Зрізи депарафінізували в ксилолі та забарвлювали толуїдиновим синім (метод Nissl).

## Результати і обговорення

Статистично значуще зменшення кількості нейронів відбулося на 4 добу після пошкодження, на 7 та 14 день дегенерація тривала в деяких зразках, тому ці зміни слід розглядати як тенденцію. Натомість виявлено значне збільшення кількості клітин, які не були нейронами і вирізнялись фагоцитарною активністю. Дослідження в динаміці виявило збільшення кількості даних клітин в усіх термінах спостереження. Після пошкодження виявлено збільшення флуоресценції GFAP в задніх рогах сірої речовини спинного мозку на 7 та 14 день, а в задніх канатиках білої речовини – на 14 день. Ці зміни полягали лише в осередковому збільшенні флуоресценції GFAP, появі окремих GFAP-позитивних клітин у задніх канатиках білої речовини та навколо центрального каналу спинного мозку.

Значне збільшення інтенсивності флуоресценції GFAP було встановлено у дні 7-14, але статистично значущої різниці між термінами не виявлено.

В експериментах була встановлена залежність деяких змін від збільшення флуоресценції GFAP, яка спостерігалась на 7-14 день, коли відбулися прогресуючі дегенеративні процеси. Очевидно, що реакція астроцитів на 14 день ще не досягла астрогліозу, як це показано в ряді публікацій [6, 7, 8].

## Висновки

Отже, збільшення кількості клітин, які не були нейронами, відбулось не за рахунок астроцитів, що дає новий напрям для подальших досліджень.

## Література

- [1] Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2016; 275 (03): 305- 15. Epub 2015 Mar 28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020> [PMid:25828533 PMCid:PMC4586307]
- [2] von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2011 Jul 7; 345 (1): 1- 19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4> [PMid:21647561]
- [3] Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol. Biol.* 2012; 814: 23- 45. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3) [PMid:22144298 PMCid:PMC3506190]
- [4] Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Duncan JA. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron*. 2016; 89 (1): 37-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013> [PMid:26687838 PMCid:PMC4707064]
- [5] Olude MA, Mustapha OA, Aderounmu OA, Olopade JO, Ihunwo AO. Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *Front Neuroanat* [Internet]. 2015 May 26; 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00067> [PMid:26074782 PMCid:PMC4443027]

- [6] Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O' Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV. Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature*. 2016; 532 (7598): 195-200. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature17623> [PMid:27027288 PMCID:PMC5243141]
- [7] Verkhratsky A., Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiological reviews*. 2017; 98 (1): 239- 389. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016> [PMid:29351512 PMCID:PMC6050349]
- [8] Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca<sup>2+</sup> as a signalling route. *ASN Neuro* 4: e00080, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1042/AN20110061> [PMid:22313347 PMCID:PMC3310306]