

Оригинальная статья / Original article

УДК 616.832-001.31-091

<https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.3.19-27>

## Характеристика нейроглии в эпицентре и в удаленной от травмы области при контузионном повреждении спинного мозга у мини-свиньи

Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов✉, В.А. Маркосян, И.С. Минязева, В.В. Валиуллин, Р.Р. Исламов

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
ул. Бутлерова, д. 49, г. Казань, 420012, Россия

### Аннотация

**Цель.** Установить отсроченное (спустя 2 месяца) влияние травмы спинного мозга (ТСМ) в нижнегрудном отделе у мини-свиньи на морфологическое состояние макро- и микроглии в близлежащих и отдаленных каудальных участках.

**Материалы и методы.** Половозрелых самок вьетнамской вислобрюхой свиньи случайным образом разделяли на две группы: с ТСМ ( $n = 3$ ) и интактную ( $n = 3$ ). Дозированную контузионную ТСМ моделировали на уровне Th8–Th9 позвонков, через 2 месяца исследовали поперечные криостатные срезы каудального сегмента, прилегающего к эпицентру травмы, и поясничного утолщения (L4–S2). Экспрессию маркеров астроцитов (глиальный фибриллярный кислый белок, glial fibrillary acidic protein, GFAP) и микроглии (ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) оценивали как относительную иммунопозитивную площадь, занимаемую клетками. При подсчете количества олигодендроглиальных клеток (фактор транскрипции олигодендроцитов 2, oligodendrocyte transcription factor 2, Olig2) учитывали наличие ядер, выявляемых при помощи 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI).

**Результаты.** После ТСМ выявлено увеличение относительных площадей, занимаемых GFAP-позитивными астроцитами и Iba1-позитивными клетками микроглии, а также уменьшение Olig2-позитивных олигодендроцитов как в области повреждения, так и в поясничном утолщении. В обеих областях спустя 2 месяца после ТСМ доля астроцитов в передних рогах существенно не отличалась, а в задних рогах увеличивалась вдвое. Клетки микроглии занимали площадь в 2,5 раза больше в передних рогах обеих областей и в задних рогах поясничного утолщения, в задних рогах в области ТСМ присутствие микроглии увеличилось незначительно (в 1,2 раза). Количество олигодендроцитов уменьшилось в области эпицентра ТСМ в передних и задних рогах в 1,5–1,75 раза, в поясничном утолщении более значимо – в 2,5 раза в передних и в 5,5 раза в задних рогах.

**Заключение.** Результаты исследования обнаружили схожую картину распределения клеток макро- и микроглии как в области ТСМ, так и в удаленных участках. Полученные данные свидетельствуют о необходимости учитывать состояние удаленных от эпицентра ТСМ участков нервной ткани при стимулировании нейрогенерации у таких пациентов.

**Ключевые слова:** вьетнамская вислобрюхая свинья; контузионная травма спинного мозга; нейроглия грудного отдела; нейроглия поясничного утолщения; иммунофлуоресцентный анализ нейроглии

### Рубрики MeSH:

МОЗГ СПИННОГО ТРАВМЫ – ПАТОЛОГИЯ

МОЗГ СПИННОГО ТРАВМЫ – ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

КОНТУЗИИ – ПАТОЛОГИЯ

КОНТУЗИИ – ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

НЕВРОГЛИЯ – ПАТОЛОГИЯ

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

**Для цитирования:** Гарифулин Р.Р., Измайлов А.А., Маркосян В.А., Минязева И.С., Валиуллин В.В., Исламов Р.Р. Характеристика нейроглии в эпицентре и в удаленной от травмы области при контузионном повреждении спинного мозга у мини-свиньи. Сеченовский вестник. 2023; 14(3): 19–27. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.3.19-27>

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

**Измайлов Андрей Александрович**, канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Адрес:** ул. Бутлерова, д. 49, г. Казань, 420012, Россия

**Тел.:** +7 (950) 322-39-76

**E-mail:** andrei.izmaylov@kazangmu.ru

**Соответствие принципам этики.** Исследование проведено с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с разрешением Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (№5-26.05.2020).

**Доступ к данным исследования.** Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у авторов по обоснованному запросу.

Данные и статистические методы, представленные в статье, прошли статистическое рецензирование редактором журнала – сертифицированным специалистом по биостатистике.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-00010.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность студентам ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», а именно Р.Х. Ахметову, А.Р. Сираевой, К.Р. Яппаровой за помощь в проведении исследования.

**Поступила:** 21.06.2023

**Принята:** 04.08.2023

**Дата публикации:** 28.09.2023

## Features of neuroglia at the epicenter of spinal cord contusion injury and at distant areas in mini-pigs

Ravil R. Garifulin, Andrey A. Izmailov✉, Vage A. Markosyan, Irina S. Minyazeva, Victor V. Valiullin, Rustem R. Islamov

*Kazan State Medical University  
49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia*

### Abstract

**Aim.** To determine the delayed (after 2 months) effect of spinal cord injury (SCI) in the lower thoracic region in the mini-pigs on the morphologic state of macro- and microglia in nearby and remote caudal areas.

**Materials and methods.** Sexually mature female Vietnamese pot-bellied pigs were randomly divided into two groups: SCI ( $n = 3$ ) and intact ( $n = 3$ ). Dosed contusion SCI was modelled at the level of the Th8–Th9 vertebrae, and transverse cryostat sections of the caudal segment adjacent to the epicenter of injury and the lumbar thickening (L4–S2) were examined 2 months later. The expression of astrocyte markers (glial fibrillary acidic protein, GFAP) and microglial markers (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) was assessed as the relative immunopositive area occupied by cells. When counting the number of oligodendroglial cells (oligodendrocyte transcription factor 2, Olig2), the presence of nuclei detectable with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was taken into account.

**Results.** After SCI, an increase in the relative areas occupied by GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microglia and a decrease in Olig2-positive oligodendrocytes were detected in both the lesion area and lumbar thickening. In both regions, 2 months after SCI, the proportion of astrocytes was not significantly different in the anterior horns and doubled in the posterior horns. Microglia cells with SCI were 2.5 times more in the anterior horns of both regions and in the posterior horns of the lumbar thickening, while the presence of microglia increased slightly (1.2 times) in the posterior horns in the SCI region. The number of oligodendrocytes decreased in the area of the epicenter of SCI in the anterior and posterior horns by 1.5–1.75 times, and in the lumbar thickening more significantly: the number decreased by 2.5 times in the anterior horn and 5.5 times in the posterior horn.

**Conclusion.** The results of the study revealed a similar pattern of macro- and microglial cell distribution both in the SCI region and in remote areas. The obtained data testify to the necessity to take into account the state of the areas of nervous tissue remote from the epicenter of SCI when stimulating neuroregeneration in such patients.

**Keywords:** Vietnamese pot-bellied pig; spinal cord contusion injury; neuroglia of the thoracic region; neuroglia of the lumbar thickening; immunofluorescent analysis of neuroglia

**MeSH terms:**

SPINAL CORD INJURIES – PATHOLOGY  
 SPINAL CORD INJURIES – PHYSIOPATHOLOGY  
 BLAST INJURIES – PATHOLOGY  
 BLAST INJURIES – PHYSIOPATHOLOGY  
 NEUROGLIA – PATHOLOGY  
 FLUOROIMMUNOASSAY

**For citation:** Garifulin R.R., Izmailov A.A., Markosyan V.A., Minyazeva I.S., Valiullin V.V., Islamov R.R. Features of neuroglia at the epicenter of spinal cord contusion injury and at distant areas in mini-pigs. *Sechenov Medical Journal*. 2023; 14(3): 19–27. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.3.19-27>

**CONTACT INFORMATION:**

**Andrey A. Izmailov**, Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University

**Address:** 49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia

**Tel.:** +7 (950) 322-39-76

**E-mail:** andrei.izmaylov@kazangmu.ru

**Ethics statements.** The study complies with the standards of the EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. All manipulations with animals were approved by the Local Bioethics Committee of the Kazan State Medical University, No. 5 of 26.05.2020.

**Data availability.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Data and statistical methods used in the article were examined by a professional biostatistician on the Sechenov Medical Journal editorial staff.

**Conflict of interests.** The authors declare that there is no conflict of interests.

**Financial support.** The research was supported by the grant from the Russian Science Foundation No. 16-15-00010.

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude to the students of Kazan State Medical University, namely, Rustem H. Akhmetov, Alina R. Siraeva, and Kamila R. Yapparova, for assistance in conducting the study.

**Received:** 21.06.2023

**Accepted:** 04.08.2023

**Date of publication:** 28.09.2023

**Список сокращений:**

ТСМ – травма спинного мозга  
 DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндола  
 GFAP – glial fibrillary acidic protein, глиальный фибриллярный кислый белок  
 Iba1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1, ионизирующая кальций-связывающая адаптерная молекула 1

низировавшая кальций-связывающая адаптерная молекула 1  
 IL-10 – interleukin-10, интерлейкин 10  
 Olig2 – oligodendrocyte transcription factor 2, фактор транскрипции олигодендроцитов 2  
 PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире ежегодно регистрируют от 250 000 до 500 000 случаев травмы спинного мозга (ТСМ)<sup>1</sup>, которая приводит к различной степени выраженности нарушений двигательных, чувствительных и вегетативных функций организма [1].

Патологические процессы, возникающие после ТСМ, включают в себя массовую гибель клеток

спинного мозга, разрывы нервных волокон, кровоизлияния, ишемические и воспалительные повреждения, на месте которых впоследствии образуются полости и кисты [2]. К сожалению, результаты терапии пациентов с тяжелой ТСМ нельзя назвать утешительными [3], что во многом связано с недостаточной изученностью клеточных механизмов, происходящих в спинном мозге при его повреждении.

<sup>1</sup> World Health Organization. Spinal cord injury. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury> (дата обращения: 13.12.2022).

Согласно современным представлениям, в ходе естественной регенерации после ТСМ вокруг эпицентра нейротравмы начинаются процессы частичного восстановления (ремоделирования) спинного мозга [2, 4]. В центре травмы формируется очаг, состоящий из эндогенных пролиферирующих фибробластов, перicyтов, эндотелиальных клеток и лейкоцитов. Одновременно с этим запускается процесс регенерации как нервных клеток, так и клеток нейроглии. Начиная с 1–2-го дня после ТСМ и примерно до 7–10 дня активно пролиферируют астроциты и мигрируют к границам формирующегося очага повреждения [5], образуя вокруг него плотную пограничную зону [6]. Непрерывные границы астроглиального рубца, состоящего из коллагена IV типа, экстрацеллюлярного матрикса и хондроитинсульфатных протеогликанов [7], препятствуют распространению воспаления из эпицентра ТСМ. На внешней границе рубца астроциты контактируют с реактивными прогениторными олигодендроглиальными клетками, экспрессирующими хондроитинсульфатный протеогликан 4, также известный как NG2 (neural/glia antigen 2, нейронный глиальный антиген 2), который, в свою очередь, блокирует прораствание аксонов через эпицентр травмы [8]. К глиальному рубцу прилегает реактивная нервная ткань, распространяющаяся от границы астроцитарного рубца во всех направлениях на значительное расстояние [4]. Она содержит все структурные элементы относительно сохранной и функционирующей нервной ткани и характеризуется наличием активированной глии, включая астроциты, микроглию и предшественники олигодендроглиоцитов, содержание которых постепенно снижается в дистальном от эпицентра направлении. Гипертрофированные реактивные астроциты активно взаимодействуют с функционирующими нейронами, вероятно, повышая их жизнеспособность [2] и способствуя локальному росту аксонов и синаптогенезу [9].

Особый интерес в реактивной нервной ткани представляют клетки микроглии. Среди них можно выделить провоспалительный (M1-подобный) и противовоспалительный прорегенеративный (M2-подобный) фенотипы, которые вносят свой вклад в процессы ответа на травму и последующего восстановления структуры спинного мозга [10]. После ТСМ активированные M1-подобные микроглиальные клетки, являясь антигенпредставляющими, экспрессируют главный комплекс гистосовместимости класса II (major histocompatibility complex class II, МНСII) и участвуют в иммунных реакциях [11]. Исследования на моделях острой и подострой ТСМ показали, что для M1-подобных макрофагов характерна более высокая экспрессия хондроитинсульфатных протеогликанов, участвующих в формировании микроокружения [12], а для M2-подобных – высокий уровень экспрессии интерлейкина 10 (interleukin-10, IL-10), трансформирующего фактора роста бета (transforming growth

factor beta, TGF- $\beta$ ) и аргиназы-1, которые оказывают положительное влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга [4], например путем индукции дифференцировки олигодендроглиоцитов через механизмы, опосредованные IL-10 [13].

**Цель исследования** – установить влияние ТСМ в нижнегрудном отделе на распределение клеток макро- и микроглии в каудальном сегменте, прилегающем к эпицентру повреждения, и в удаленной от него области (поясничном утолщении спинного мозга) у мини-свиньи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых 4-месячных самках вьетнамской вислобрюхой свиньи весом 20–25 кг. В течение двух недель до операции животных содержали одиночно в загоне с 12-часовым периодом чередования светлого и темного времени суток, со свободным доступом к воде и корму.

В день операции животных разделили случайным образом на две группы: интактные животные ( $n = 3$ ) и мини-свиньи с контузионной ТСМ ( $n = 3$ ). Премедикацию проводили с помощью внутримышечного введения 1,5 мл 2% раствора ксилазина (0,1 мл/кг), 1,5 мл раствора тилетамина и золазепам (0,1 мл/кг) и цефтриаксона (1 гр / 5 мл). После чего подопытному животному подключали ингаляционный наркоз (Minor Vet Optima, Zoomed, США) путем введения смеси 2,0–2,5% изофлурана (Laboratorios Karizoo, S.A., Испания) с кислородом. Контузионную ТСМ моделировали по протоколу, который использован нами ранее [14]. После ламинэктомии на уровне Th8–Th9 позвонков металлический цилиндр импактора фиксировали на расстоянии 1 мм от поверхности спинного мозга. Дозированную контузионную травму вызывали с помощью груза массой 50 г, падающего с высоты 50 см на участок спинного мозга, покрытого твердой мозговой оболочкой.

Забор спинного мозга у мини-свиней проводили через 2 месяца после моделирования нейротравмы. Животных выводили из эксперимента, вводя в глубокий наркоз с помощью золазепам 100 объемом 0,5 мл в/м и постепенно повышая концентрацию изофлурана до 5,0 об.% ингаляционно. Для иммунофлуоресцентного анализа выделяли каудальный отдел спинного мозга длиной 5 мм на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы, а также поясничное утолщение (L4–S2).

У интактных животных забирали идентичные области спинного мозга. Полученные образцы постфиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma, США) при 4 °C в течение 12 ч, с целью криопротекции инкубировали в 30% растворе сахарозы (Sigma, США). Свободно плавающие поперечные срезы спинного мозга толщиной 20 мкм нарезали на криостате Microm HM 560. Срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline,

PBS) с 1% Triton X-100 в течение 5 минут 3 раза, неспецифические места связывания первичных антител блокировали в PBS с 1% тритоном X-100 и 5% сывороткой осла в течение 1 часа при комнатной температуре.

Астроциты выявляли с помощью первичных антител против глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP), олигодендроглиальные клетки с помощью антител против фактора транскрипции олигодендроцитов 2 (oligodendrocyte transcription factor 2, Olig2), клетки микроглии с помощью антител против ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) (табл. 1). Первый этап реакции проводили при температуре 4 °С в течение 12 ч. После промывки в PBS срезы инкубировали 2 ч. при комнатной температуре с вторичными антителами, описанными в таблице 1.

Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 10 мкг/мл (Sigma, США). Цифровые изображения структур спинного мозга получали с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и анализировали в квадрате площадью 0,05 мм<sup>2</sup> в программе ImageJ (НИН, США). В качестве негативного контроля специфичности иммунофлуоресцентной реакции срезы спинного мозга окрашивали только вторичными антителами. Серое вещество исследовали: в передних рогах – VII, VIII, IX пластины; в задних рогах – I, II, III, IV пластины (по Рекседу). Экспрессию маркеров астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) оценивали как относительную иммунопозитивную площадь, занимаемую клетками. При подсчете количества олигодендроглиальных клеток (Olig2-иммунопозитивных) учитывали наличие ядер, выявляемых при помощи DAPI.

### Статистический анализ

Описательные статистики представлены в виде медиан 1-го и 3-го квартилей. Для сравнения значений количественных переменных между группами

применяли тест Краскела – Уоллиса. Для попарных межгрупповых сравнений использовали тест Данна, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ полученных данных проводили в среде для статистических вычислений R 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Австрия).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

При иммунофлуоресцентном анализе площади астроцитов (GFAP-позитивных клеток) в передних рогах отдела спинного мозга, прилегающего к эпицентру травмы, у животных после ТСМ и у интактных существенной разницы не обнаружено (рис. 1А): 25,11 (21,35; 28,34)% vs. 22,59 (19,94; 25,66)%;  $p > 0,05$ . В задних рогах спинного мозга у мини-свиней после ТСМ GFAP-иммунопозитивная площадь была больше по сравнению с интактными животными: 12,53 (11,69; 13,73)% vs 6,23 (4,36; 8,73)%;  $p = 0,0173$  (рис. 1).

При анализе количества астроцитов в поясничном утолщении в задних рогах обнаружено увеличение GFAP-позитивной площади у животных после ТСМ по сравнению с интактными животными: 19,87 (15,68; 23,70)% vs. 10,10 (9,17; 12,10)%;  $p = 0,002$ . В передних рогах эти значения у опытных и интактных животных значительно не различались и составили 23,54 (17,83; 29,59)% и 20,89 (16,18; 25,88)% соответственно;  $p > 0,05$  (рис. 1).

Количество олигодендроцитов (Olig2-позитивных клеток) в передних и задних рогах в области эпицентра травмы в опытной группе было значительно снижено: 20,2 (20,0; 21,2) и 24,5 (22,25; 25) соответственно, по сравнению с интактной группой: 34,0 (34,0; 40,4) и 43 (40,75; 45,5) соответственно;  $p = 0,0002$  и  $p < 0,0001$  (рис. 2).

В поясничном утолщении количество Olig2-позитивных клеток у интактных мини-свиней составило 12 (11; 13) в передних и 16,5 (16; 20,75) в задних рогах. При этом у мини-свиней после ТСМ выявлено меньшее количество Olig2-позитивных клеток – 5 (4; 6) и 3 (2; 4,25) соответственно;  $p < 0,0001$  и  $p = 0,0001$  (рис. 2).

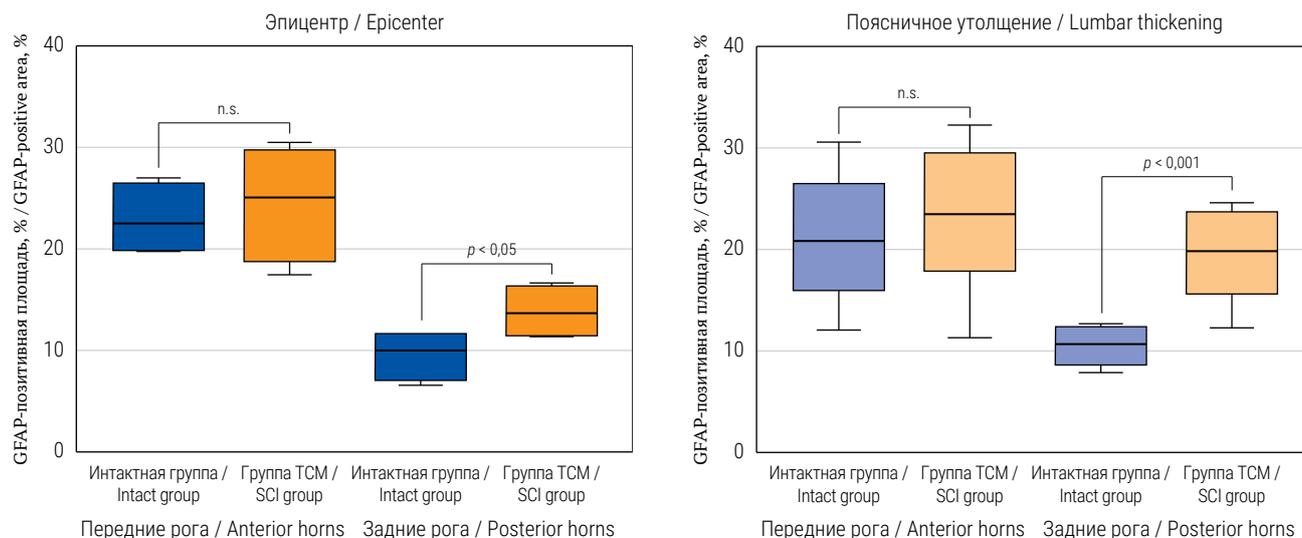
**Таблица 1. Первичные и вторичные антитела, использованные для идентификации астроцитов, олигодендроцитов и клеток микроглии в срезах спинного мозга мини-свиней**

**Table 1. Primary and secondary antibodies used to label astrocytes, oligodendrocytes, and microglia in mini-pig spinal cord sections**

Маркеры / Markers	Происхождение / Origin	Разведение / Dilution	Производитель / Manufacturer
GFAP (моноклональные/ monoclonal) <sup>a</sup>	Мышь / Mouse	1:200	Santa Cruz (Cat#sc-33673)
Iba1 (моноклональные / monoclonal) <sup>a</sup>	Кролик / Rabbit	1:150	Abcam (Cat # ab178847)
Olig2 (моноклональные / monoclonal) <sup>a</sup>	Кролик / Rabbit	1:100	Abcam (Cat # ab220796)
Anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 <sup>b</sup>	Осел / Donkey	1:200	Invitrogen (Cat#A-21202)
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 647 <sup>b</sup>	Осел / Donkey	1:200	Invitrogen (Cat#A-31573)

Примечание: <sup>a</sup> – первичные антитела; <sup>b</sup> – вторичные антитела.

Note: <sup>a</sup> – primary antibodies; <sup>b</sup> – secondary antibodies.

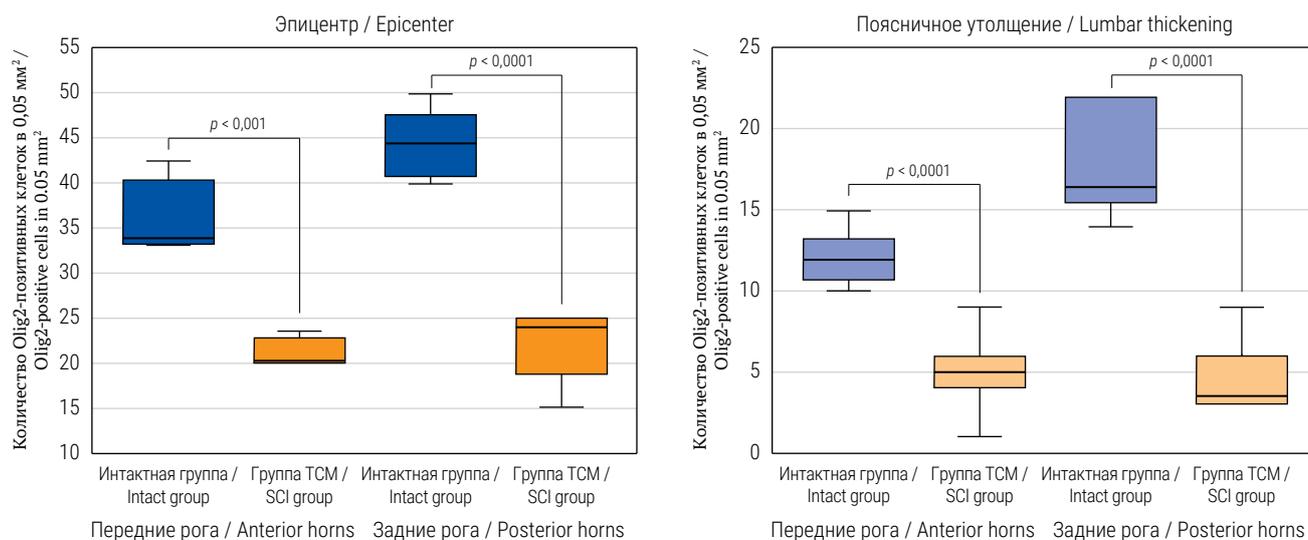


**РИС. 1.** Количественный анализ GFAP-позитивных площадей в спинном мозге мини-свиней через 2 месяца после моделирования ТСМ.

**FIG. 1.** Quantitative analysis of GFAP-positive areas in the spinal cord of mini-pigs 2 months after SCI modelling.

Примечание: n.s. – not significant, не значимо; ТСМ – травма спинного мозга.

Note: n.s. – not significant; SCI – spinal cord injury.



**РИС. 2.** Количественный анализ Olig2-позитивных клеток в спинном мозге мини-свиней через 2 месяца после моделирования ТСМ.

**FIG. 2.** Quantitative analysis of Olig2-positive cells in the spinal cord of mini-pigs 2 months after SCI modelling.

Примечание: ТСМ – травма спинного мозга.

Note: SCI – spinal cord injury.

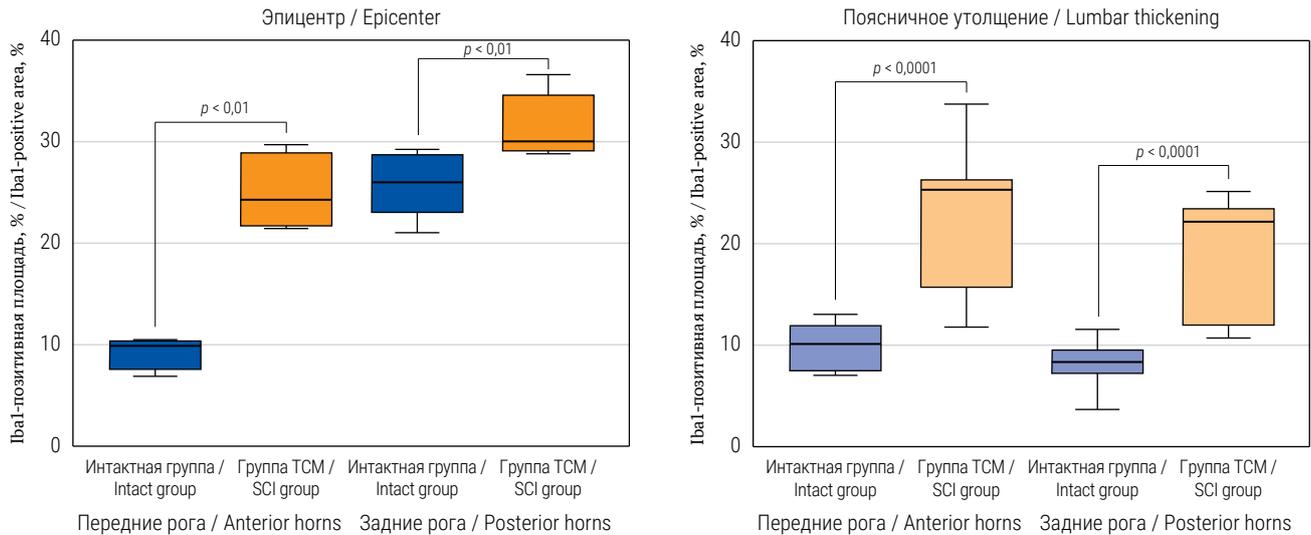
Увеличение клеток микроглии (площадь Iba1-позитивных участков) выявлено в передних и задних рогах в области эпицентра травмы у животных с ТСМ: 24,31 (22,10; 27,19)% и 30,37 (29,29; 32,43)% соответственно, при сравнении с интактными мини-свиньями: 9,87 (8,87; 10,26)% и 26,10 (23,89; 28,09)% соответственно;  $p = 0,0053$  и  $p = 0,0014$  (рис. 3).

Iba1-позитивная площадь, занимаемая клетками микроглии, в поясничном утолщении была больше как в передних, так и задних рогах у мини-свиней

с ТСМ: 25,41 (20,50; 26,25)%;  $p = 0,0001$  и 22,19 (14,29; 23,53)% соответственно;  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными животными: 9,80 (7,35; 10,61)% и 8,12 (7,58; 8,79)% соответственно (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что через 2 месяца после ТСМ у мини-свиней как в каудальном отделе спинного мозга, прилегающем к эпицентру травмы, так и в удаленной области



**РИС. 3.** Количественный анализ Iba1-позитивных клеток в спинном мозге мини-свиней через 2 месяца после моделирования TCM.

**FIG. 3.** Quantitative analysis of Iba1-positive areas in the spinal cord of mini-pigs 2 months after SCI modelling.

Примечание: TCM – травма спинного мозга.

Note: SCI – spinal cord injury.

поясничного отдела происходит схожая посттравматическая реакция, проявляющаяся в увеличении площадей, занимаемых астроцитами (GFAP-позитивными клетками) и клетками микроглии (Iba1-позитивными клетками), участвующими в формировании глиального рубца, и одновременном уменьшении количества олигодендроцитов (Olig2-позитивных клеток), отвечающих за миелинизацию нервных волокон [2].

Полученные нами данные свидетельствуют о развитии хронического процесса, распространяющегося на удаленный от эпицентра TCM поясничный отдел спинного мозга. Анализ литературных источников также свидетельствует, что TCM вызывает нейровоспаление не только в эпицентре повреждения [2], но и в обширных зонах вокруг него в обоих (краниальном и каудальном) направлениях [11].

TCM оказывает длительное разрушительное воздействие на независимость и активность в повседневной жизни пациента, наносит физический и психологический ущерб [15]. Инвалидизация пациентов с TCM является значимой социально-экономической проблемой не только для пациента и членов его семьи, но и для государства. Ограниченная регенерация клеток в центральной нервной системе – ключевая проблема, которую необходимо решить при разработке новых методов лечения TCM. Экспериментальные подходы к посттравматическому морфофункциональному восстановлению спинного мозга первоначально разрабатываются на моделях TCM у животных, но они не могут быть напрямую экстраполированы на пациентов со спинномозговой травмой. Мини-свиньи по анатомическим особенностям нервной системы, физиологическим и биохимическим характеристикам приближены

к человеку и считаются наиболее оптимальными животными для доклинических исследований [15].

Ремоделирование спинного мозга после TCM носит многогранный характер [11]. В эпицентре образуется очаг первичного повреждения с последующей активацией клеток микроглии и воспалительной инфильтрацией нейтрофилами, макрофагами, клетками резидентной микроглии [16]. Дегенерации поврежденных нервных волокон из очага TCM, а также проходящих через него, способствуют астроциты и микроглия, они же участвуют в реципрокной активации других нейронов [11]. В итоге происходит разрушение нервных волокон нисходящих и восходящих путей, прерывается связь между нейронами головного и спинного мозга. Воспалительный ответ подробно охарактеризован в зоне травмы [17], однако до сих пор недостаточно изучен в областях, удаленных от области повреждения [11]. При этом важность таких сведений для разработки новых методов терапии более чем очевидна.

На преодоление патогенетических и патоморфологических событий в подострой и хронической фазах TCM направлены такие современные стратегии лечения, как генная терапия (повышение выживаемости клеток спинного мозга, стимулирование роста аксонов, сдерживание развития нейровоспаления и предотвращение образования астроглиального рубца) и электростимуляция (содействие нейропластичности и интеграции эфферентных и афферентных сигналов, способствующих функциональному восстановлению спинного мозга). Согласно последним исследованиям, надлежит уделять внимание предотвращению патологических изменений спинного

мозга не только в сегментах, прилежащих к эпицентру травмы, но и в отдаленных областях.

### Ограничения исследования

Большинство работ, посвященных изучению патогенетических и патоморфологических процессов при ТСМ, сфокусировано главным образом на эпицентре первичного повреждения. В настоящем исследовании нами представлены данные о реакции клеток макро- и микроглии в каудальных сегментах спинного мозга после контузионной травмы в нижнегрудном отделе у мини-свиней. Однако патологический процесс распространяется и в краниальном направлении. В этой связи требуется проведение дополнительных исследований реорганизации клеток нейроглии выше эпицентра повреждения.

### Направления для дальнейших исследований

Одним из аспектов последствий ТСМ является ремоделирование клеток нейроглии. Изучение

### ВКЛАД АВТОРОВ

Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, В.А. Маркосян, И.С. Минязева провели исследование и собрали материал. Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов проанализировали результаты. В.В. Валиуллин, Р.Р. Исламов написали и отредактировали текст рукописи. Р.Р. Исламов – руководитель работы, разработал идею исследования, сформулировал цели и задачи и осуществлял руководство работой. Все авторы утвердили окончательную версию публикации.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Якушин О.А., Агаджанян В.В., Новокионов А.В. Анализ летальных исходов у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой в остром периоде. Политравма. 2019; (3): 55–60. EDN: CWGZER / Yakushin O.A., Agadzhanian V.V., Novokshonov A.V. Analysis of lethal outcomes in patients with spine and spinal cord injury in the acute period. Polytrauma. 2019; (3): 55–60 (In Russian). EDN: CWGZER
2. O'Shea T.M., Burda J.E., Sofroniew M.V. Cell biology of spinal cord injury and repair. J Clin Invest. 2017; 127(9): 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28737515
3. Parthiban J., Zileli M., Sharif S.Y. Outcomes of spinal cord injury: WFNS Spine Committee Recommendations. Neurospine 2020; 17 (4): 809–819. <https://doi.org/10.14245/ns.2040490.245>. PMID: 33401858
4. Alizadeh A., Dyck S.M., Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. Front Neurol. 2019; 10: 282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>. PMID: 30967837
5. Ren Y., Ao Y., O'Shea T.M., et al. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. Sci Rep. 2017; 7: 41122. <https://doi.org/10.1038/srep41122>. PMID: 28117356
6. Sofroniew M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. Nat Rev Neurosci. 2015; 16(5): 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>. Erratum in: Nat Rev Neurosci. 2015 Jun; 16(6): 372. PMID: 2589150
7. Klapka N., Müller H.W. Collagen matrix in spinal cord injury. J. Neurotrauma 2006 Mar-Apr; 23(3–4): 422–435. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.422>. PMID: 16629627

патогенеза спинальной нейротравмы на мини-свиньях в нашей модели должно включать в себя исследование процессов: молекулярной перестройки внеклеточного матрикса, нейровоспаления, дегенерации и регенерации нервных проводников, реорганизации транстрауматической нейронной сети и особенно вопросов нарушения и восстановления гемато-спинального барьера.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования продемонстрировали схожую картину распределения макро- и микроглии как в сохранной нервной ткани, каудально прилегающей к эпицентру ТСМ, так и в отдаленном участке поясничного утолщения. Ремоделирование нейроглии в удаленных от места повреждения спинного мозга областях является важным процессом, который следует учитывать при разработке способов нейрорегенерации у пациентов с ТСМ.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ravil R. Garifulin, Andrey A. Izmailov, Vage A. Markosyan, Irina S. Minyazeva – conducting a research and data collection. Ravil R. Garifulin, Andrey A. Izmailov – data curation and analysis. Victor V. Valiullin, Rustem R. Islamov – writing and editing the draft of the article. Rustem R. Islamov – work leader, conceptualization, supervision. All authors approved the final version of the publication.

8. Krupa P., Siddiqui A.M., Grahn P.J., et al. The translesional spinal network and its reorganization after spinal cord injury. Neuroscientist. 2022; 28(2): 163–179. <https://doi.org/10.1177/1073858420966276>. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33089762
9. Khakh B.S., Sofroniew M.V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat Neurosci. 2015; 18(7): 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>. PMID: 2610872
10. Orr M.B., Gensel J.C. Spinal cord injury scarring and inflammation: therapies targeting glial and inflammatory responses. Neurotherapeutics. 2018; 15(3): 541–553. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0631-6>. PMID: 29717413
11. Chelyshev Y. More attention on segments remote from the primary spinal cord lesion site. Front Biosci (Landmark Ed). 2022; 27(8): 235. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2708235>. PMID: 36042182
12. Mikita J., Dubourdieu-Cassagno N., Deloire M.S., et al. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. Mult Scler. 2011; 17(1): 2–15. <https://doi.org/10.1177/1352458510379243>. Epub 2010 Sep 2. PMID: 20813772
13. Dyck S., Kataria H., Alizadeh A., et al. Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTPs receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury. J Neuroinflammation. 2018; 15(1): 90. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1128-2>. PMID: 29558941
14. Islamov R.R., Bashirov F.V., Sokolov M.E., et al. Gene-modified leucoconcentrate for personalized *ex vivo* gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury. Neural Regen Res. 2021;

- 16(2): 357–361. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.290902>. PMID: 32859798
15. Schomberg D.T., Miranpuri G.S., Chopra A., et al. Translational relevance of swine models of spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2017; 34(3): 541–551. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4567>. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27492951
16. Nakajima H., Honjoh K., Watanabe S., et al. Distribution and polarization of microglia and macrophages at injured sites and the lumbar enlargement after spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 2020; 737: 135152. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135152>. Epub 2020 Jun 9. PMID: 32531528
17. Islamov R., Bashirov F., Izmailov A., et al. New therapy for spinal cord injury: autologous genetically-enriched leucoconcentrate integrated with epidural electrical stimulation. *Cells*. 2022; 11(1): 144. <https://doi.org/10.3390/cells11010144>. PMID: 35011706

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Гарифулин Равиль Расимович**, аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6503-2316>

**Измайлов Андрей Александрович**✉, канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-4636>

**Маркосян Варе Аршалуйсович**, ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>

**Минязева Ирина Салаватовна**, студентка ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3159-1144>

**Валиуллин Виктор Владимирович**, д-р биол. наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-6373>

**Исламов Рустем Робертович**, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6632-4636>

**Ravil R. Garifulin**, postgraduate student, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6503-2316>

**Andrey A. Izmailov**✉, Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-4636>

**Vage A. Markosyan**, Assistant Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>

**Irina S. Minyazeva**, student, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3159-1144>

**Victor V. Valiullin**, Dr. of Sci. (Biology), Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-6373>

**Rustem R. Islamov**, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6632-4636>

✉ Автор, ответственный за переписку / Corresponding author