

НЕЙРОХІРУРГІЯ

УДК 611-013.7/.8:612.014.1:616-003.725

*І.Г. Васильєва, Н.Г. Чопик, Н.П. Олексенко, І.М. Шуба, О.І. Цюбко,
О.С. Галанта, Н.Д. Сніцар*

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

**МОДЕЛЮВАННЯ НЕЙРОТРАВМИ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ
СЕРОТОНІНЕРГІЧНИХ ПРОВІДНИХ ШЛЯХІВ
В УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ**

Експериментальну травму наносили шляхом механічного перетину нейритно-гліальних волокон. Після цього контрольні зрізи культивували в стандартних умовах, а до експериментальних зразків додавали суспензію фетальних клітин зони *p. raphe*, збагачену прогеніторами серотоніногенезу. Через два тижні всі зразки досліджували з використанням гістохімічних, ІФА та ЗТ-ПЛР методів. Встановили, що механічний перетин нейритно-гліальних волокон *p. raphe* призводить до морфологічних дегенеративних змін, а також до зниження експресії генів серотоніногенезу та вмісту серотоніну. Сумісне культивування з фетальними клітинами гальмує ретроградну дегенерацію пошкоджених серотонінергічних волокон, сприяє відновленню морфології структурних елементів, підвищує загальний рівень серотоніну та стимулює експресію комплексу генів-регуляторів серотоніногенезу – *Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Trh 1, Trh 2, Sert*. Отримані дані свідчать, що між ушкодженими клітинами в культурі та фетальними активованими до серотоніногенезу клітинами відбувається взаємодія, яка сприяє підтримці регенераційних процесів серотонінергічних нейронів.

Ключові слова: *органотипова культура, серотонінергічні нейрони p. raphe, механічна травма in vitro, серотонін, Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Trh 1, Trh 2, Sert.*

Серотонінергічна система активно реагує на травматичні ушкодження мозку зміною щільності SERT-позитивних волокон в тканині мозку, що супроводжується зниженням рівня нейромедіатора [1, 2]. Після травми змінюється рівень експресії генів серотоніногенезу *Trh 1, Trh 2, Sert*, які контролюють метаболізм зрілих диференційованих серотонінергічних нейронів [3].

В сучасних дослідженнях з метою вивчення впливу травматичного ушкодження на цільову популяцію клітин використовують моделі травми *in vitro*. Доведено, що при використанні моделей *in vitro* результати в 90 % випадків відповідають аналогічним результатам при моделюванні *in vivo* [4, 5]. Для дослідження впливу травматичного ушкодження на тканину головного мозку розроблено декілька моделей *in vitro*: компресійна, динамічна (прискорення/гальмування), гід-

родинамічна, механічна (транссекція) [4, 5]. В сучасній науковій літературі висвітлюються також результати дослідження *in vitro* метаболізму серотонінергічних структур головного мозку в умовах травматичного ушкодження [6–8].

В нашому дослідженні регенераційного потенціалу фетальних клітин *p. raphe* щурів, збагачених прогеніторами серотоніногенезу по відношенню до органотипової культури зрілих серотонінергічних нейронів цієї ж зони, використовували транссекцію як метод травмування *in vitro*. Для оцінки впливу досліджували морфологічні ознаки регенераційного процесу.

Матеріал і методи. Під час експериментального утримання лабораторних тварин маніпуляції, які з ними проводились, відповідали протоколу Комітету з медичної етики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад.

А.П. Ромоданова», розробленому у відповідності з чинним законодавством.

Для отримання клітин, збагачених попередниками серотоніногенезу, використовували суспензію нервових клітин фетального мозку шурів стадії E16. Для отримання культурального матеріалу в стерильних умовах головний мозок звільняли від оболонки та видаляли зону *p. raphe*. Тканину суспендували у розчині Хенкса (РАА, Австрія) шляхом механічного піпетування, підраховували вміст живих клітин та доводили їх концентрацію до $(1-3) \cdot 10^6$ в 1 мл. Протягом одного тижня зразки культивували на середовищі Ігла (РАА, Австрія) із додаванням 10 % термоінактивованої фетальної телячої сироватки (РАА, Австрія), збагаченому факторами EGF (epidermal growth factor) і FGF (fibroblast growth factor) в концентрації 40 нг/мл (Sigma, США). На два тижні для стимуляції серотоніногенезу в поживне середовище додавали BDNF (brain derived neurotrophic factor) в концентрації 50 нг/мл (Sigma, США). Загальну кількість і вміст живих клітин підраховували в гемцитометрі за допомогою забарвлення 0,2%-вим розчином трипанового синього (Janssen Chemica, Бельгія).

Органотипову тканину для довгострокового культивування отримували виконуючи сагітальні зрізи *p. raphe* новонароджених шурів. Культивування проводили на скельцях, вкритих ПЕІ (поліетиленіміном), у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Заміну поживного середовища проводили кожні 3–4 доби. Після 5 тижнів культивування моделювали травматичне ураження за методом С. Loov [9], шляхом механічного перетину нейрогліальних волокон, після чого контрольні та зразки після трансекції тричі промивали розчином Хенкса. Після травми контрольні зразки залишали в поживному середовищі, а до дослідних додавали дисоційовану культуру фетальних клітин зони *p. raphe*, збагачених попередниками серотоніногенезу. Після цього контрольні та дослідні зразки культивували два тижні.

Серотонін в клітинах виявляли за допомогою гістохімічної реакції Фалька–Хілларпа із використанням 1%-вого параформальдегіду (Janssen Chemica, Бельгія) та 2%-вої глюксілової кислоти (Janssen Chemica, Бельгія) [10].

Флуоресценцію в клітинах досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа в системі IBAS 2000. Клітини підраховували в

10 полях зору кожного досліджуваного препарату.

Рівень серотоніну досліджували методом конкурентного твердофазового імуоферментного аналізу з використанням діагностичного набору RE 59121 (IBL, Німеччина). Попереднє ацилювання зразків проводили згідно з інструкцією до набору.

Дослідження експресії генів-регуляторів серотоніногенезу – Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Trp 1, Trp 2, Sert, проводили методом ЗТ-ПЛР (зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції) з використанням специфічної пари праймерів [11–14]. Геному ДНК виділяли з використанням наборів «ДНК-сорб В» (Amplisens, Росія), РНК – з використанням наборів «Рибо-сорб» (Amplisens, Росія). Реакцію зворотної транскрипції здійснювали з використанням набору RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit™ (Fermentas, Литва).

Отримані продукти ампліфікації склалися з 374, 492, 109, 184, 117, 127 п.н. (пар нуклеотидів) відповідно. Візуалізація продуктів ампліфікації проводилася за допомогою електрофорезу в 2%-вому агарозному гелі.

Результати. Дослідження нативних культур показало, що в них зберігається значна частина життєздатних нервових волокон і міжклітинних зв'язків (рис. 1 і 2). Великої радіальної зони росту ці тканинні експлантати не формували, що пояснюється морфологічними особливостями зони, з якої отримані зрізи, в ній містяться переважно провідні нервові елементи. Проте місцями спостерігаються направлений ріст аксонів і встановлення зв'язків між сусідніми структурами (рис. 1, 2).

Механічний перетин нейрогліальних волокон призводить до деструктивних змін в них як безпосередньо в зоні перетину, так і в ділянках, наближених до тіла нейрона (рис. 3). Спостереження за живою, незабарвленою культурою в процесі культивування показали, що такі деструктивні зміни проявляються, як поява темних аморфних ділянок з великою кількістю детриту.

На препаратах, забарвлених за Фальком–Хілларпом, в зонах перетину і ділянках, наближених до тіл клітин, повністю відсутня флуоресценція, тобто морфологічна дегенерація прямо пов'язана з функціональними порушеннями транспорту серотоніну (рис. 3). Генетичні дослідження показали повну відсутність експресії генів-регуляторів серотоніногенезу в культуральному матеріалі (рис. 4).

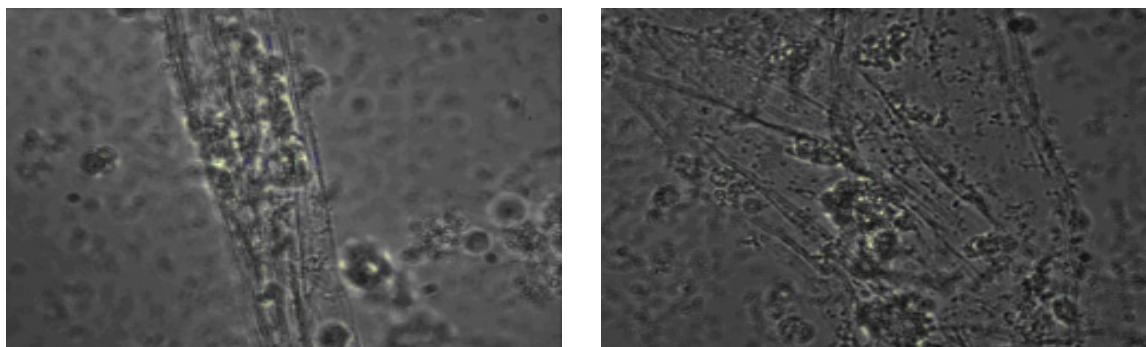


Рис. 1. Довгострокова тканнна культура зони ядер шва щура. Мережа нейрогліальних волокон. 5 тижнів культивування. 20 x 10. Нативна культура, незабарвлений препарат

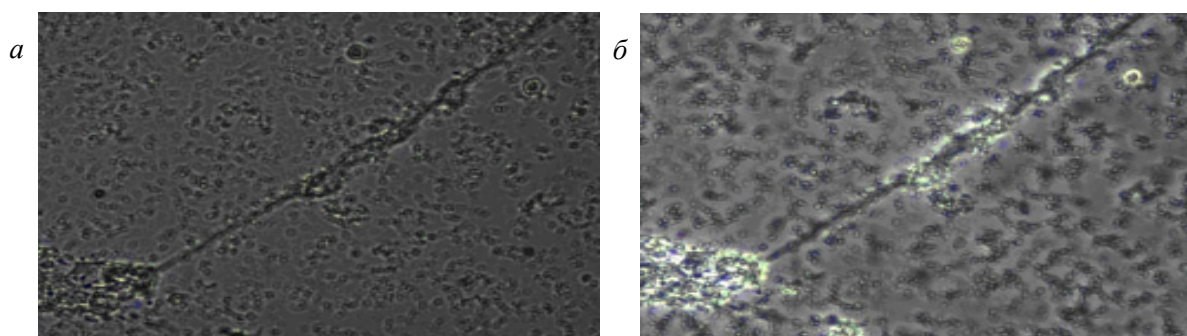


Рис. 2. Довгострокова тканнна культура зони ядер шва щура. Нейрогліальне волокно. 5 тижнів культивування. 10 x 10:

a – нативна культура, незабарвлений препарат; *б* – нативна культура в поляризованому світлі

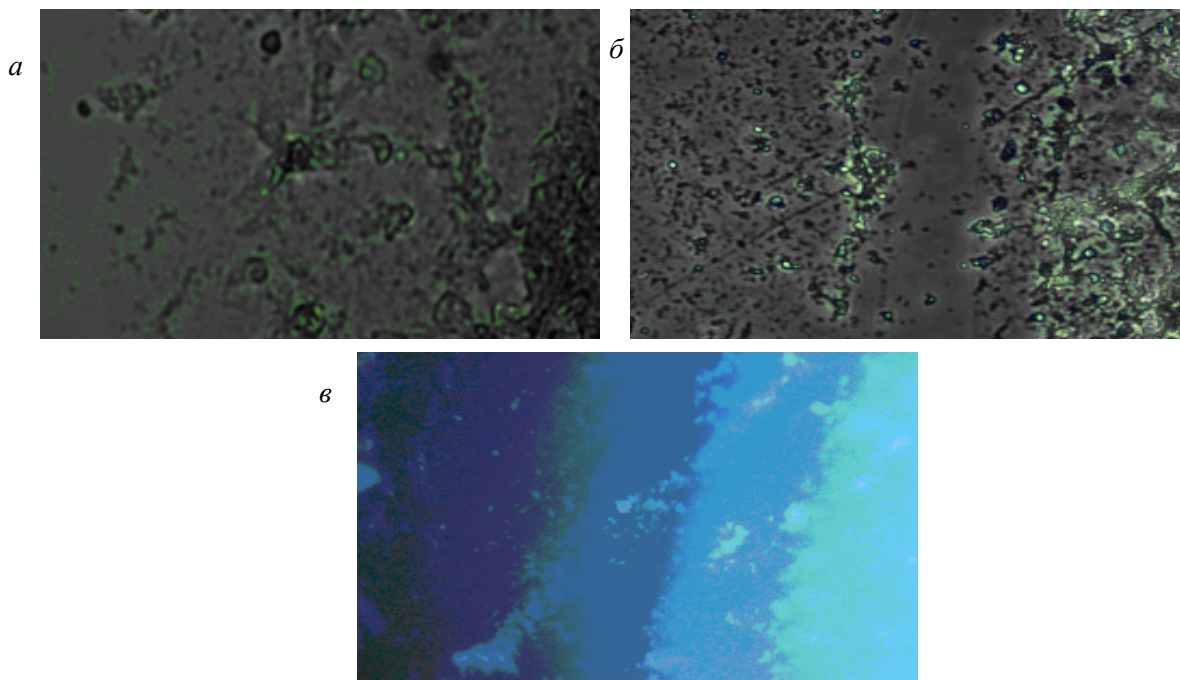


Рис. 3. Довгострокова тканнна культура зони ядер шва щура. Модель травми (2-га доба). Перетин нейрогліального волокна. 5,5 тижнів культивування:

a – нативна культура, незабарвлений препарат, 10 x 10; *б* – нативна культура, незабарвлений препарат, 20 x 10; *в* – виявлення серотоніну за методом Фалька–Хіларпа, 20 x 10

При подальшому культивуванні в контрольних культурах не спостерігалось відновлення нейрогліальних волокон – лише по-

глиблення процесів ретроградної дегенерації з подальшим відмиранням травмованих ділянок і зон, наближених до них (рис. 5). Ушкод-

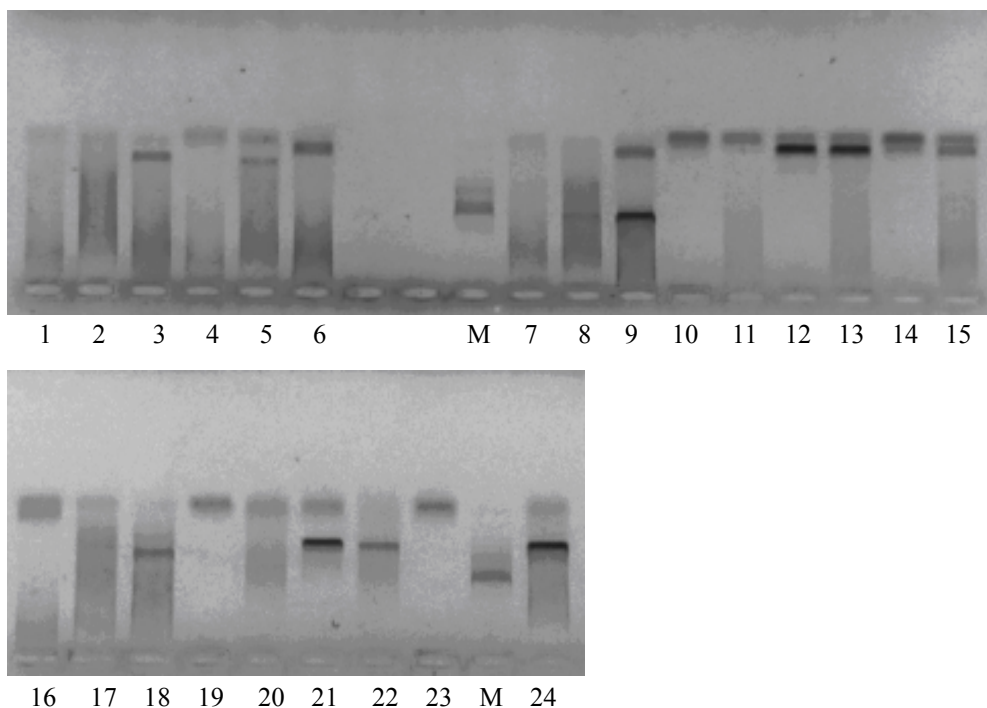


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів Nkx 2.2 (374 п.н.), Lmx 1b (492 п.н.), Pet 1 (109 п.н.), Trp 1 (184 п.н.), Trp 2 (117 п.н.), Sert (127 п.н.) в суспензійній та тканинній культурах клітин ядер шва щура:

- 1 – РНК гена Trp 1 при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 2 – РНК гена Trp 1 в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 3 – РНК гена Trp 1 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури;
- 4 – РНК гена Trp 2 при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 5 – РНК гена Trp 2 в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 6 – РНК гена Trp 2 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури;
- 7 – РНК гена Sert при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 8 – РНК гена Sert в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 9 – РНК гена Sert 2 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури;
- 10, 11 – ДНК, РНК гена Pet 1 при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 12, 13 – ДНК, РНК гена Pet 1 в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 14, 15 – ДНК, РНК гена Pet 1 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури;
- 16 – РНК гена Lmx 1 при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 17 – РНК гена Lmx 1 в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 18 – РНК гена Lmx 1 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури
- 19, 20 – ДНК, РНК гена Nkx 2.2 при моделюванні травматичного ушкодження в умовах культури;
- 21, 22 – ДНК, РНК гена Nkx 2.2 в суспензійній культурі фетальних нервових клітин;
- 23, 24 – ДНК, РНК гена Nkx 2.2 при додаванні фетальних нервових клітин після моделювання травматичного ушкодження в умовах культури;
- М – маркер молекулярної маси (100–1000 п.н.)

жені волокна виглядали «пунктирними» по всій довжині (рис. 5). Але в неушкоджених зонах транспорт серотоніну залишався, і, за даними ІФА, його рівень становив $(8,52 \pm 0,91)$ нг/мг білка.

В паралельній серії експерименту до травмованих зрізів зони ядер шва була додана суспензія фетальних клітин *in vitro*, попередньо стимульована до клітинної експансії та направлено диференціювання по серотонін-

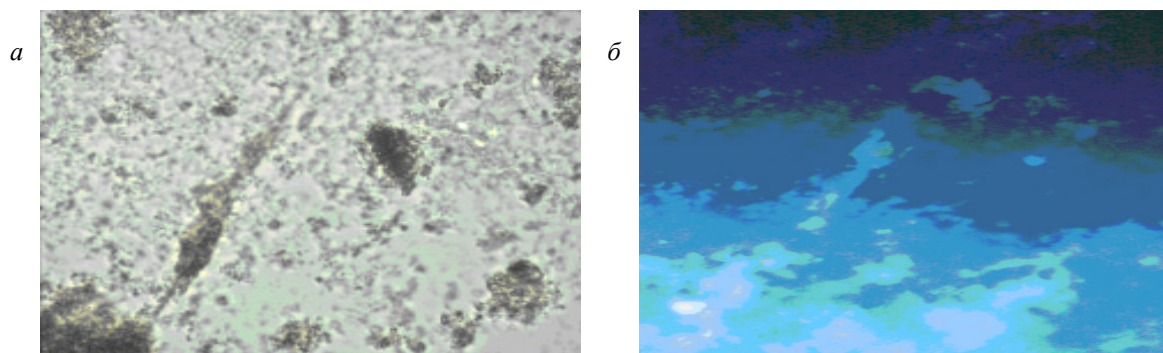


Рис. 5. Довгострокова тканинна культура зони ядер шва щура. Модель травми (14-та доба).

Перетин нейрогліального волокна та його подальша деструкція. 7 тижнів культивування:

a – нативна культура, незабарвлений препарат, 10 x 10;

б – виявлення серотоніну за методом Фалька-Хіллара, 20 x 10

ергічному типу в культуральних умовах. Ці клітини характеризувались експресією генів *Nkx 2.2* та *Pet 1* (див. рис. 4), тобто знаходились у фазі активації серотоніногенезу. Вміст живих клітин становив (85–90) %, серотоніну – (1,76±0,68) нг/мг білка.

Спостереження за нативною культурою показали, що фетальним клітинам властива тропність до зон ушкодження. Вже через 1–2 доби сумісного культивування вони концентруються вздовж травмованих волокон і в зоні перетину. Через 7 діб вздовж деструктованого волокна щільно розташовані округлі невеликі клітини (рис. 6). При подальшому культивуванні відбувається заміщення ушкоджених ділянок нейритно-гліальних волокон тілами та відростками фетальних клітин, а інколи формуються нові волокна поруч із зруйнованими (рис. 6, 7). Спостерігається також проростання волокон крізь зону перетину. Гістохімічне забарвлення показало наявність флуоресцентних гранул, що транспортуються по новоутворених волокнах (рис. 6, 7).

Слід відмітити, що фетальні клітини концентруються біля кінцевих ділянок трансекції нейрогліальних провідних шляхів великого діаметра, супроводжуються зменшенням дегенеративних ознак.

За даними генетичних досліджень, при додаванні фетальних клітин в культуральному матеріалі активізується експресія всього комплексу генів-регуляторів серотоніну, включаючи *Trh* та *Sert*, що не спостерігалось ні в травмованих контрольних культурах, ні в популяції фетальних клітин окремо. Вміст серотоніну при сумісному культивуванні досягнув (11,66±0,97) нг/мг білка, що також перевищує сумарне значення контрольних і фетальних зразків на 13 %.

Обговорення результатів. Отримані нами продемонстрували, що в умовах культивування після травматичного ушкодження спостерігаються процеси, подібні до ретроградної дегенерації *in vivo*. Механічне ушкодження серотонінергічних волокон внаслідок трансекції призводить до підтвердженого

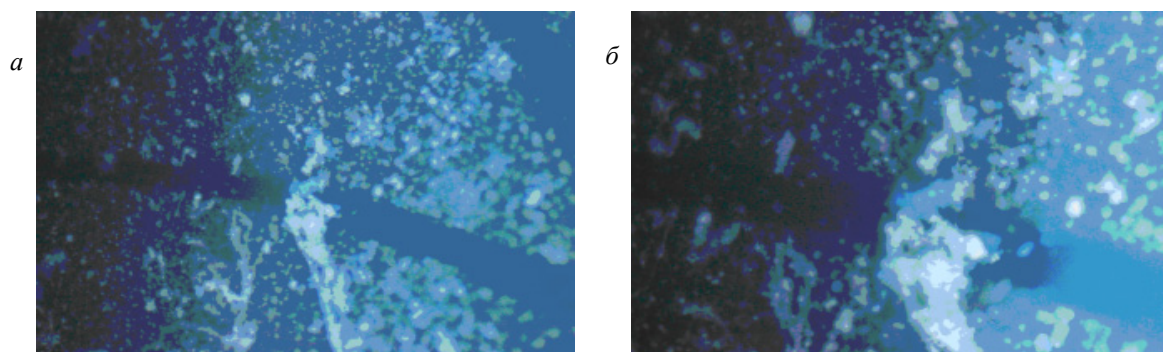


Рис. 6. Довгострокова тканинна культура зони ядер шва щура. Модель травми з підсадкою суспензії фетальних нервових клітин (14-та доба). Перетин нейрогліального волокна та відновлення його структури. 7 тижнів культивування. Виявлення серотоніну за методом Фалька-Хіллара, 10 x 10 (*a*) та 20 x 10 (*б*)

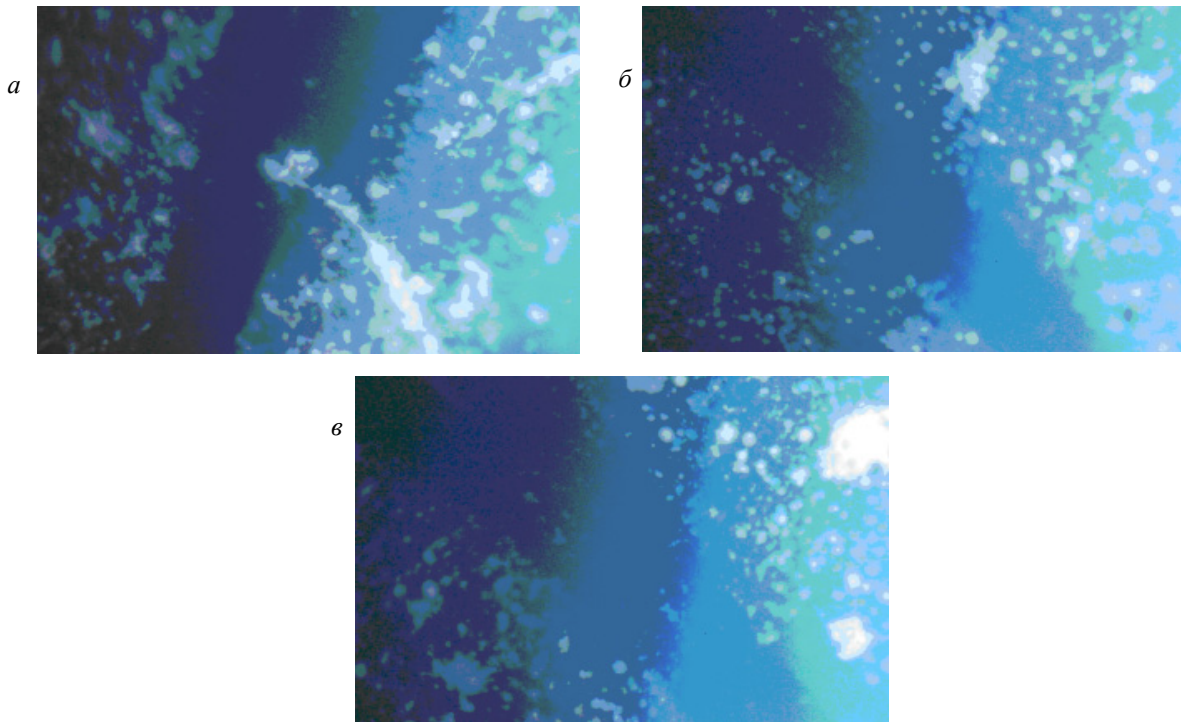


Рис. 7. Довгострокова тканинна культура зони ядер шва щура. Модель травми з додаванням суспензії фетальних нервових клітин (14-та доба). Перетин нейрогліального волокна та відновлення його структури. 7 тижнів культивування.
а – в – виявлення серотоніну за методом Фалька–Хіларпа, 10 x 10

гістохімічним і імуноферментним методами зниження рівня серотоніну, а генетичні дослідження вказують на дерегуляцію експресії основних генів серотоніногенезу.

Додавання фетальних клітин, збагачених серотонінергічними прогеніторними клітинами, про що свідчить підвищений рівень експресії Nkx 2.2, маркера мітотично-активних попередників серотонінергічних нейронів, стимулює в культуральній органотипічній системі *n. garhe* експресію всього каскаду відповідних генів-регуляторів серотоніногенезу, що в поєднанні з даними аналізу гістохімічних препаратів, а також даними ІФА стосовно підвищення рівня серотоніну вказують на активізацію регенераційних процесів.

Умови проведення експерименту не дають можливості з'ясувати, в яких саме клітинах відбувається експресія. Це можуть бути травмовані клітини *n. garhe*; стовбурові та прогеніторні клітини зрізів *n. garhe*, в яких під впливом фетальних активованих до серотоніногенезу клітин або трофічних факторів, які вони здатні синтезувати, активізується серотоніногенез. Не можна виключити і диференціювання внесених прогеніторів та здійс-

нення ними замісного ефекту в травмованих зонах. Важливим висновком є те, що додавання екзогенної активованої до серотоніногенезу популяції клітин призводить до відновлення серотоніногенезу в ушкодженій структурі *n. garhe*, що може бути важливою передумовою відновлення функції незалежно від того, яка саме популяція клітин вносить максимальний вклад у цей процес.

Висновки

Отримані дані свідчать, що при моделюванні нейротравми серотонінергічних провідних шляхів в органотипічній культурі відсутня експресія генів-регуляторів серотоніногенезу, що супроводжується зниженням рівня серотоніну. Додавання фетальних серотонін-стимульованих клітин здійснює стимулюючий ефект, який виявляється на морфологічному і генетичному рівні. Взаємовплив культивованих клітин викликає активацію каскаду серотонінергічних генів-регуляторів і зростання вмісту в культивованих клітинах рівня нейромедіатора, що візуально проявляється як морфологічна регенерація ушкоджених зон.

Список літератури

1. Особенности метаболизма в травмированном полушарии большого мозга после экспериментальной черепно-мозговой травмы и трансплантации фетальной нервной ткани / Б.А. Бараненко, В.И. Цимбалюк, И.Г. Васильева, Н.Г. Чопик // Украинский нейрохирургический журнал. – 2014. – № 1. – С. 26–31.
2. *Papesh M.A.* Plasticity of serotonergic innervation of the interior colliculus in mice following acoustic trauma / M.A. Papesh, L.M. Hurley // *Hear Res.* – 2012. – Vol. 283 (1–2). – P. 89–97.
3. Impulsivity and concussion in juvenile rats: examining molecular and structural aspects of the frontostriatal pathway / H. Hehar, K. Yeates, B. Kolb et al. // *Plos One.* – 2015. – Vol. 10 (10): e0139842.doi:10.1371.
4. In vitro models of traumatic brain injury. – B. Morrison 3rd, B.S. Elkin, J.P. Dolle, M.L. Yarmush. – *Annu Rev Biomed Eng.* – 2011. – Vol. 13. – P. 91–126.
5. *Kumaria A.* In vitro models of neurotrauma / A. Kumaria, C.M. Tolia. – *Br J Neurosurg.* – 2008. – Vol. 22. – P. 200–206.
6. *Higuchi M.* Augmentation of serotonin release by sustained exposure to MDMA and methamphetamine in rat organotypic mesencephalic slice cultures containing raphe serotonergic neurons / M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Yatani. – *J. Neurochemistry.* – 2008. – Vol. 106. – P. 2410–2420.
7. Nagayasu K. Utility of organotypic raphe slice cultures to investigate the effects of sustained exposure to selective 5-HT reuptake inhibitors on 5-HT release British / K. Nagayasu, Y. Yatani, M. Kitaichi. – *J. Pharmacology.* – 2010. – Vol. 161. – P. 1527–1541.
8. Daviaud N. Modeling nigrostriatal degeneration in organotypic cultures, a new ex vivo model of Parkinson's disease / N. Daviaud, E. Garbayo, N. Lautram. – *Neuroscience.* – 2014. – Vol. 256. – P. 10–22.
9. *Loov C.* Identification of injury specific proteins in a cell culture model of traumatic brain injury / C. Loov, G. Shevchenko, G. Nadadhur // Retrieved from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055983>
10. *Лунна Х.* Основы гистохимии / Х. Лунна. – М.: Мир, 1980. – С. 252–266.
11. *James A.* Noggin on heaven's door: a factor that promotes the selective production of serotonergic neurons from murine embryonic stem cells and induces pluripotent stem cells / A. James, A. Wascek. – *J. Neurochemistry.* – 2012. – Vol. 122 (1). – P. 1–3.
12. *Jijun L.* Abnormal expression of dopamine and serotonin transporters associated with the pathophysiologic mechanism of Tourette syndrome / L. Jijun, L. Zaiwang, L. Anyuan. – *Neuro India.* – 2010. – Vol. 58 (4). – P. 523–529.
13. *Bertrand R.L.* Serotonin availability in rat colon is reduced during a Western diet model of obesity / R.L. Bertrand, S. Senadheera, A. Tanoto // *Am. J. Physiology.* – 2012. – Vol. 303. – P. 424–434.
14. *Zeng X.* Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells / X. Zeng, J. Cai, J. Chen // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22 (6). – P. 925–940.
15. *Werner J.K.* Traumatic brain injury: recent advances in plasticity and regeneration / J.K. Werner, R.D. Stevens // *Curr Opin Neurol.* – 2015. – Vol. 28 (6). – P. 565–573.
16. *Laskowitz D.* Translation research in traumatic brain injury / D. Laskowitz, G. Grant. – Boca Raton (FL): Taylo & Francis Group LLG, 2016.

И.Г. Васильева, Н.Г. Чопик, Н.П. Олексенко, И.Н. Шуба, О.И. Цюбко, Е.С. Галанта, Н.Д. Сницар

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОТРАВМЫ И РЕГЕНЕРАЦИИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ ПРОВОДЯЩИХ ПУТЕЙ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Экспериментальную травму наносили путем механического пересечения нейритно-глиальных волокон. После этого контрольные срезы культивировали в стандартных условиях, а к экспериментальным добавляли суспензию фетальных клеток зоны п. гархе, обогащенную прогениторами серотониногенеза. Через две недели все образцы исследовали с использованием гистохимических, ИФА и РТ-ПЦР методов. Установили, что механическое пересечение нейритно-глиальных волокон зоны п. гархе вызывает морфологические дегенеративные изменения, а также снижение экспрессии генов серотониногенеза и содержания серотонина. Совместное культивирование с фетальными клетками тормозит ретроградную дегенерацию поврежденных серотонинергических волокон, способствует восстановлению морфологии поврежденных элементов, повышает общий уровень серотонина и стимулирует экспрессию комплекса генов-регуляторов серотониногенеза – Nkx 2.2,

Lmx 1b, Pet 1, Tph 1, Tph 2, Sert. Полученные данные свидетельствуют о том, что между поврежденными клетками в культуре и фетальными активированными прогениторами серотониногенеза осуществляется взаимодействие, способствующее поддержанию регенераторных процессов серотонинергических нейронов.

Ключевые слова: органотипическая культура, серотонинергические нейроны, n. raphe, травма in vitro, серотонин, Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Tph 1, Tph 2, Sert.

I.G. Vasileva, N.G. Chopic, N.P. Oleksenko, I.N. Shuba, O.I. Tsybko, E.S. Galanta, N.D. Snitsar
BRAIN INJURY AND REGENERATION MODEL OF SEROTONINERGIC TRACTS IN CULTURE

A standardized injury was induced by scalpel cuts through a culturing tissue. After that, the control slices were cultured in the standard conditions and to the experimental slices suspension of fetal mesencephalic cells, expanded in vitro and enriched of serotonin progenitors, was added. 2 weeks later all slices were analyzed by histochemical (for serotonergic neuron count), IFA (to establish serotonin level) and RT-PCR (to examine the expression of genes, which regulate serotoninogenesis – Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Tph 1, Tph 2, Sert) methods. We have established the degenerated changes in the n. raphe tissue jointly with decreasing disappearing some serotoninogenesis genes expressing level and serotonin content after mechanical dissection in vitro. Our results showed, that co-culturing of organotypic mesencephalic slices with suspension of in vitro expanded serotonin progenitors, prevented the retrograde degeneration, promoted the morphological regeneration, increased the serotonin level and neuronal survivality. Our finding suggests the availability of interaction between the injured neurons and activated serotonergic progenitors which promoted the regeneration. Moreover, it stimulated all serotonin regulated genes expression. So, using in vitro model system we demonstrated the necessity of active progenitors for serotonergic system recovery.

Key words: organotypic slices culture, raphe serotonergic neurons, injury, serotonin, Nkx 2.2, Lmx 1b, Pet 1, Tph 1, Tph 2, Sert.

Поступила 16.11.16