

Количественный и морфометрический анализ клеток нервной ткани после ишемического инсульта на мышах

Научный руководитель – Бакаева Занда Валериевна

Алексеев Вячеслав Иванович

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия

E-mail: slava.slava.aleks@yandex.ru

Введение. Изучение изменений в нервной ткани после инсульта позволит в будущем управлять репаративными процессами в терапевтических целях. На сегодняшний день существуют различные стратегии анализа: подсчет количества клеток разных типов, анализ их отдельных морфологических параметров и анализ совокупностей морфологических параметров (Leyh, J. et al., 2021).

Цель данной работы – подбор оптимального метода анализа изменений после инсульта на примере модели фототромбоза.

Материалы и методы. В рамках работы мы использовали мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J. У животных (группа «ФТ», $n = 9$) вызывали фотоиндуцированную ишемию коры больших полушарий (бенгальский розовый 20 мг/кг в/в, далее - освещение 532 нм 10 мВт 10 мин, $\varnothing = 1$ мм). Контрольной группе («К», $n = 8$) бенгальский розовый не вводили. Через 21 день животных забивали и проводили окрашивание срезов мозга 35 мкм по Нисслию и иммуногистохимически (ИГХ) на маркеры Iba1 (микроглия) и GFAP (астроциты). Подсчет проводили на расстоянии 300, 800 и 1300 мкм от границы очага ишемии (у «К» выбирали те же точки по стереотаксическим координатам).

Результаты и обсуждение. Не было выявлено статистически значимых различий по числу клеток каждого типа при анализе срезов, окрашенных по Нисслию. Число поврежденных нейронов в расчете на 10000 мкм² составило 14 (13 – 17), 13 (11 – 15) и 10 (8 – 12) шт. (на 300, 800 и 1300 мкм соответственно); астроцитов – 4 (4 – 5), 4 (4 – 5) и 4 (3 – 6); микроглиальных клеток – 6 (4 – 6), 4 (4 – 5) и 4 (4 – 5) шт., соответственно (мед. (Q1-Q3)). Анализ числа GFAP+ астроцитов выявил статистически значимое увеличение на расстоянии 300 и 800 мкм от очага у группы «ФТ» («ФТ»: 2, 2 и 1 шт./10000мкм²; «К»: 0, 0 и 0 кл./10000мкм², на 300, 800 и 1300 мкм, соответственно, Two-way ANOVA, $p < 0.05$, см. рис. 1). Значимое увеличение числа Iba1+ клеток наблюдалось только вблизи очага инсульта («ФТ»: 4, 4 и 3 кл./10000 мкм²; «К»: 4, 3 и 3, на 300, 800 и 1300 мкм, соответственно, Two-way ANOVA, $p < 0.05$, см. рис. 2). Доля активированной (GFAP+) астроглии у группы «ФТ» вблизи очага инсульта (300 мкм) составила 54.93 (+/- 13.48) % от общего количества астроглиальных клеток, рассчитанного при анализе по Нисслию. В дополнение к количественному анализу была проведена 3D реконструкция клеток астроглии и микроглии с конфокальных снимков, окрашенных ИГХ. Выполнен расчет их морфологических характеристик и классификация на подтипы.

Выводы. Сопоставление данных, полученных на стандартных гистологических срезах, иммуногистохимии и морфометрического анализа индивидуальных клеток дает глубокое и всестороннее представление о постишемических изменениях в нервной ткани после инсульта.

Источники и литература

- 1) Leyh, J., Paeschke, S., Mages, B., Michalski, D., Nowicki, M., Bechmann, I., & Winter, K. (2021). Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.701673>

Иллюстрации

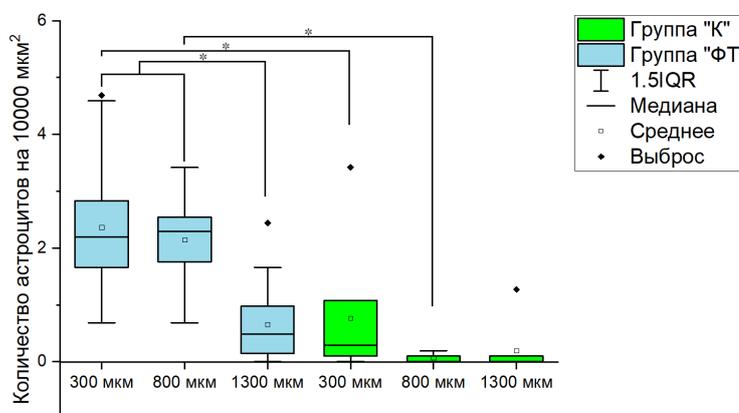


Рис. : Рис. 1. Изменение количества астроцитов у мышей «ФТ» и «К» на расстояниях 300, 800 и 1300 мкм от очага

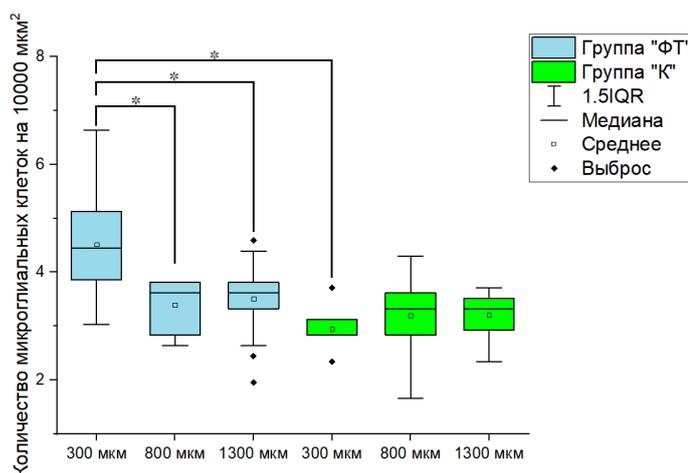


Рис. : Рис. 2. Изменение количества микроглиальных клеток у мышей «ФТ» и «К» на расстояниях 300, 800 и 1300 мкм от очага