

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ЭКСПРЕССИЯ ПАРВАЛЬБУМИНА, ОСТЕОПОНТИНА И ГЛИПИКАНА 4  
В НЕЙРОНАХ ОТДАЛЕННОГО ОТ ЭПИЦЕНТРА ТРАВМАТИЧЕСКОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА**

© 2024 г. О. Н. Тугова<sup>1</sup>, И. М. Кабдеш<sup>1\*</sup>, Я. О. Мухамедшина<sup>1,2</sup>, Ю. А. Чельшев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

\*E-mail: ikabdes@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 13.08.2024 г.

Принята к публикации 14.08.2024 г.

Травма спинного мозга (ТСМ) проявляется патологическими изменениями в областях, значительно отдаленных от области первичного повреждения. Для поиска потенциальных терапевтических мишеней с целью восстановления двигательной функции особенно актуально выявить причины и механизмы этих сдвигов в поясничном отделе спинного мозга при повреждении в проксимальных его отделах. На модели дозированной контузионной ТСМ крысы на уровне сегмента Th8 изучена экспрессия Са-связывающего белка парвальбумина (PARV), остеопонтина (OPN) и глипикана 4 (GPC4) в нейронах пластинок VII, VIII и IX в пределах сегментов L3–4 на 7-е и 60-е сутки эксперимента. В пластинках VII и IX в острую и хроническую фазу ТСМ показано уменьшение количества PARV<sup>+</sup> нейронов, что может указывать на снижение связывания кальция в нейронах передних рогов на уровне сегментов L3–4. Снижение экспрессии PARV в этих нейронах указывает на повышение риска их уязвимости и нарушения двигательной функции. Впервые изучен характер экспрессии OPN в нейронах поясничного отдела, отдаленного от эпицентра травматического повреждения. Во всех изученных пластинках в передних рогах серого вещества нами не отмечены сдвиги в количестве OPN<sup>+</sup> нейронов как в острой, так и в хронической фазе ТСМ. В пластинке IX поясничного отдела выявлено увеличение количества GPC4<sup>+</sup> нейронов в остром посттравматическом периоде, что можно рассматривать в ключе позитивной приспособительной реакции нейронов в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга. Оценка этой реакции как позитивной основана на данных о связывании заякоренного на поверхности нейрона GPC4 с различными молекулами, обладающими нейротекторной активностью и стимулирующими нейрорегенерацию.

*Ключевые слова:* травма спинного мозга, отдаленное повреждение, парвальбумин, остеопонтин, глипикан

**DOI:** 10.31857/S0869813924090051, **EDN:** AJVIPE

## ВВЕДЕНИЕ

Травма ЦНС запускает каскад молекулярных и клеточных событий в эпицентре повреждения. При этом патологические сдвиги выявлены в отдаленных отделах головного и спинного мозга [1–4]. Причины и механизмы этих сдвигов остаются неясными.

Становится все более очевидным, что при травме спинного мозга (ТСМ) в стратегии восстановления функции важно учитывать патологические сдвиги не только в области травматического повреждения, но и в отдаленном от эпицентра отделе. При ТСМ в шейном или грудном отделе, помимо эпицентра повреждения, особый интерес для выяснения механизмов пластичности и нейрорегенерации представляет недооцененный поясничный отдел, содержащий нейронные сети, критически важные для поддержания и восстановления двигательной функции. В хроническую фазу ТСМ в поясничном отделе происходит реорганизация нейронных сетей и приспособление их к функционированию в новых условиях [5–8].

После ТСМ в грудном отделе в поясничном отделе отмечены признаки усиления пластичности, связанные с появлением чувствительности нейронов к низким уровням нейротрансмиттеров, повышенным синаптогенезом и ремоделированием синапсов [9–11]. Все это предполагает возможность реактивации локальных нейронных сетей и улучшения двигательной функции [12]. Для понимания механизмов патологических изменений в отдаленном от эпицентра травмы поясничном отделе и оценки перспектив восстановления функции важно выявить сдвиги в экспрессии функционально значимых молекул в острой и хронической фазе ТСМ. Из достаточно большого списка подобных молекул для данного исследования мы наметили парвальбумин (PARV), остеопонтин (OPN) и глипикан 4 (GPC4).

Ca-связывающие белки регулируют гомеостаз кальция в нейронах. Из них наиболее изучены кальбиндин D28K, кальретинин и PARV, принадлежащие к семейству с белковым доменом EF-hand. В спинном мозге тормозные PARV+ интернейроны способны быстро увеличивать частоту спайков [13–17]. Интерес к этим нейронам обусловлен критической важностью процесса торможения для восстановления двигательной функции при ТСМ [6, 18, 19]. В передних рогах PARV экспрессируется достаточно большим количеством интернейронов [13, 20, 21]. У человека этот Ca-связывающий белок присутствует в 63% спинальных мотонейронов [22].

Актуальность изучения PARV+ нейронов на модели ТСМ обусловлена уже имеющимися данными о том, что уровень экспрессии PARV отрицательно коррелирует с уязвимостью нейронов к повреждению. Дефицит Ca-связывающих белков PARV и кальбиндина D28K делает мотонейроны особенно чувствительными к гиперкальциевой токсичности в результате активации глутаматных рецепторов [23].

Интерес к OPN связан с его способностью поддерживать контролируемые нейротрофинами внутриклеточные сигнальные каскады в процессе регенерации аксонов в ЦНС [24]. Гиперэкспрессия OPN индуцирует возобновление роста аксонов зрительного нерва и образование функционирующих синапсов в верхних холмиках [25]. OPN рассматривается в качестве маркера мотонейронов в спинном мозге [26]. OPN обнаружен примерно у 70% крупных холинацетилтрансфераза-(ChAT) иммунопозитивных мотонейронов [26], контролируя их резистентность при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) путем модуляции экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9) [27].

Одна из разновидностей протеогликанов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток многих типов, представлена гепарансульфат протеогликанами, которые включают глипиканы (GPCs) [28]. GPCs представлены семейством эволюционно консервативных белков, связанных с мембраной нейронов при помощи гликозилфосфатидилинозитола.

У крысы методом гибридизации *in situ* показана экспрессия GPCs в нейронах центральной и периферической нервной системы [29]. Другим источником GPCs служат астроциты. Так, секретлируемый астроцитами GPC4 индуцирует образование активных возбуждающих синапсов путем рекрутирования глутаматных рецепторов AMPA на постсинаптической мембране, а также стимулирует высвобождение из пресинаптических окончаний нейронального пентраксина 1, фактора кластеризации рецепторов

АМРА, путем передачи сигналов через пресинаптическую рецепторную протеинтирозинфосфатазу дельта (RPTPδ) [30].

GPCs взаимодействуют со многими растворимыми и нерастворимыми лигандами. Среди них хемокины, морфогены, факторы роста, рецепторы, синаптогенные молекулы и молекулы внеклеточного матрикса [31, 32]. GPCs вместе с другими многочисленными секретлируемыми синаптическими организаторами в ЦНС участвуют в опосредованном астроцитами синаптогенезе и регуляции синаптической активности [30, 33–35]. Участие GPCs в процессах нейропластичности и нейрорегенерации при ТСМ остается практически неизученным.

Цель нашего исследования – установление возможных сдвигов в экспрессии функционально значимых белков PARV, OPN и GPC4 в нейронах VII, VIII и IX пластинки в передних рогах серого вещества поясничного отдела спинного мозга крысы в остром и хроническом периоде при дозированной контузионной ТСМ в грудном отделе.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

В эксперименте использовали взрослых самок крыс линии Wistar (250–300 г,  $n = 15$ ). Животные были случайным образом разделены на интактные (контрольные,  $n = 5$ ) и экспериментальные ( $n = 10$ ) группы. Крыс содержали в стандартных условиях (12-часовой цикл освещения) с питанием, доступным *ad libitum*.

### *Моделирование ТСМ*

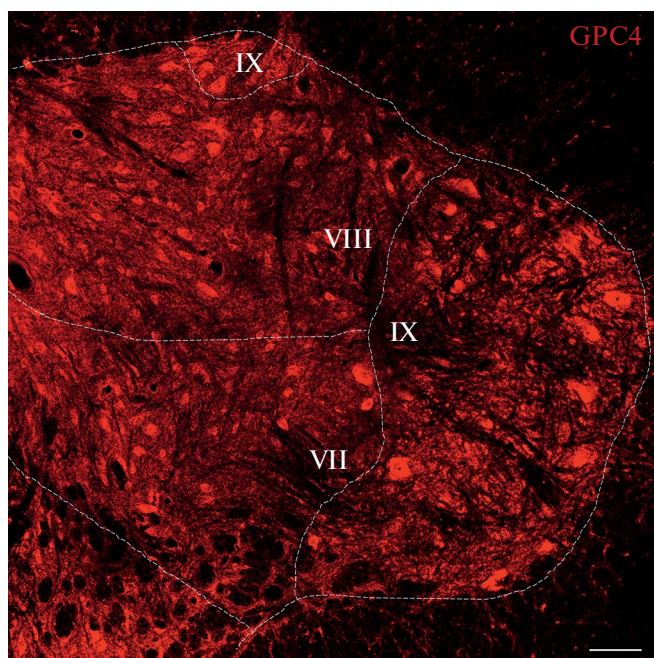
После внутримышечной инъекции золетила (20 мг/кг, Virbac Sante Animale, Франция) экспериментальных крыс подвергали глубокой анестезии изофлураном. Рассекали фасцию и параостистые мышцы, после чего выполняли ламинэктомию на уровне 8-го грудного (VTh8) позвонка, соответствующего сегменту Th8. ТСМ высокой степени тяжести (4 м/с) воспроизводили с помощью импактора Impact One Stereotaxic Impactor (Leica, Германия). После воспроизведения ТСМ животным вводили энрофлоксацин (2.5 мг/кг, Livisto, Испания) внутримышечно один раз в день в течение 7 дней после ТСМ. Мочевые пузыри опорожняли вручную дважды в день до начала самостоятельного мочеиспускания.

### *Иммунофлуоресцентный анализ*

Крыс на 7-е и 60-е сутки после ТСМ ( $n = 5$  крыс в каждой группе) анестезировали хлоралгидратом, затем транскардиально последовательно перфузировали холодным (4 °C) фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7.4) и 4%-ным забуференным формалином (BioVitrum, Россия). Указанные сроки соответствуют острому и хроническому периоду ТСМ крысы. После перфузии выделяли позвоночный столб с последующей фиксацией в течение 12 ч в 4%-ном забуференном формалине, затем аккуратно извлекали из него фрагмент спинного мозга, соответствующий сегментам L3–4 поясничного отдела, и подвергали криоконсервации в градиенте сахарозы (15% и 30%). Далее получали срезы толщиной 20 мкм с использованием криостата FS800A (RWD Life Science Co., КНР). Для прицельного исследования передних рогов в поясничном отделе спинного мозга после травмы на уровне VTh8 использовали поперечные срезы спинного мозга, соответствующие сегментам L3–4.

Для иммунофлуоресцентного анализа нейронов срезы спинного мозга блокировали 5%-ной нормальной ослиной сывороткой (NDS) в течение 30 мин при комнатной температуре (RT), затем инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами против PARV (1: 400, Sigma-Aldrich, P3088, США), OPN (1: 200, Cloud-Clone Corp., PAA899Ra01, КНР), GPC4 (1: 100, Cloud-Clone Corp., PAA998Ra01, КНР), ядра кле-

ток окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, D9542, США). Вторичные антитела, меченные флуорофором, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. NDS, первичные и вторичные антитела разводили в 0.1%-ном Triton X-100 в PBS. Срезы заключали на предметные стекла с использованием заключающей среды ImmunoHistoMount (Abcam, ab104135, США). Срезы, инкубированные только со вторичными антителами (без первичных антител), использовали в качестве контроля реакции. Срезы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия), количественный анализ нейронов в пластинках осуществляли ручным методом при помощи маски, накладываемой на изображения (рис. 1).



**Рис. 1.** Иммунофлуоресцентный анализ. Визуализация экспрессии GPC4 в различных пластинках (VII, VIII, IX) передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) спинного мозга крысы. Масштаб: 100 мкм (10×).

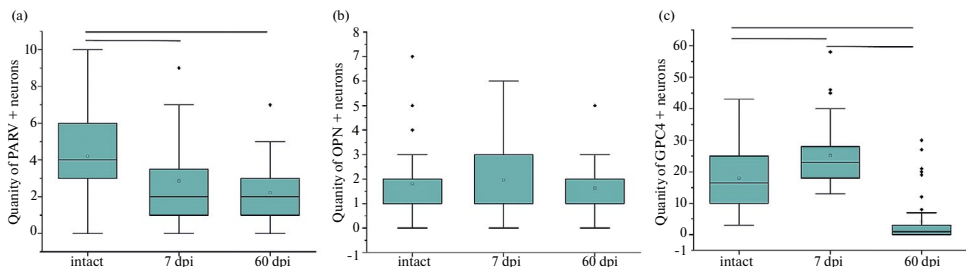
Для количественного анализа все срезы были получены с использованием идентичных настроек конфокального микроскопа («laser intensity», «gain», «offset»). На конфокальных изображениях во всей области передних рогов измеряли интегральную интенсивность флуоресценции GPC4 аналогично описанному ранее методу [36]. Количественный подсчет клеток и анализ интегральной интенсивности флуоресценции производили на пяти серийных срезах, полученных от каждой крысы, в области передних рогов на уровне сегментов L3–4. Исследования проводились двумя наблюдателями для обеспечения правильной идентификации иммунореактивности. Оба исследователя были «ослеплены» относительно экспериментальных и контрольных групп. Дополнительно нами было отмечено отсутствие сдвигов в характере и интенсивности флуоресценции в реакции с антителами против GPC4 в сериях как с предварительной пермеабиллизацией срезов, так и без нее, что указывает на присутствие искомого антигена в цитоплазме нейронов.

## Статистический анализ

Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Origin 7.0 SR0 (OriginLab, США). Результаты были представлены в виде ящиков с “уса-ми” (боксплотов) и столбчатых диаграмм и выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ). Для различных сравнений между всеми экспериментальными и контрольными группами был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с тестом Тьюки. Тест Крускала – Уоллиса использовали для проверки общей разницы в медианных уровнях между группами, при этом для множественных сравнений применяли поправку Данна. Средние различия между экспериментальными группами считали значимыми при достижении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Пластинка VII.* В отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе (сегменты L3–4) выявлено уменьшение количества PARV+ нейронов в  $\sim 2$  раза ( $p < 0.05$ ) как на 7-е, так и на 60-е сутки после нанесения травмы в грудном отделе (рис. 2a). При этом в сегментах L3–4 количество нейронов, экспрессирующих OPN, оставалось неизменным на обоих сроках наблюдения (рис. 2b). Количество экспрессирующих GPC4 нейронов (рис. 2c) возрастало на 7-е сутки (в 1.4 раза при сравнении с интактным контролем и в 6 раз при сравнении с показателем на 60-е сутки,  $p < 0.05$ ). К 60-м суткам этот показатель существенно уменьшался (в 4.3 раза при сравнении с интактным контролем и в 6 раз при сравнении с показателем на 7-е сутки,  $p < 0.05$ ).



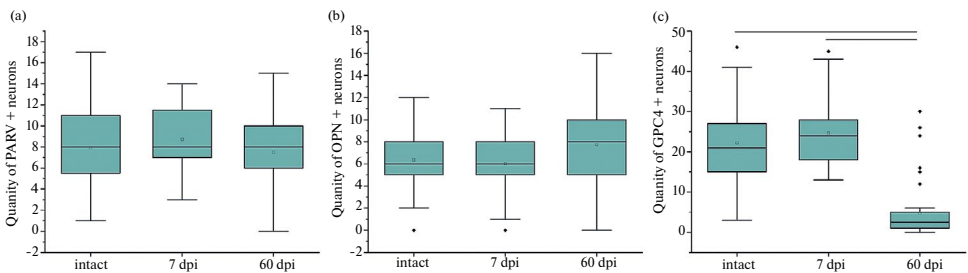
**Рис. 2.** Количество (a) PARV+, (b) OPN+, (c) GPC4+ нейронов в VII пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury);  $p < 0.05$ , тест Крускала – Уоллиса.

Уменьшение количества нейронов, экспрессирующих PARV, в пластинке VII может быть связано с гибелью или дисфункцией интернейронов задних ядер Кларка и нейронов промежуточных ядер вследствие травмы. Это предположение кажется менее вероятным, чем просто уменьшение экспрессии PARV в переживающих нейронах пластинки VII в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе. В ряде работ с ТСМ в грудном отделе гибель нейронов в отдаленном поясничном отделе не была обнаружена [37–39]. Стабильность количества нейронов, экспрессирующих OPN, с учетом не обнаруженных нами изменений данного показателя в пластинке VII можно интерпретировать как признак их устойчивости к травматическому повреждению.

В исследуемой области (сегменты L3–4) нами выявлено увеличение количества GPC4+ нейронов на 7-е сутки (в 1.4 раза при сравнении с интактным контролем, в 6 раз при сравнении с 60-ми сутками,  $p < 0.05$ ) и уменьшение к 60-м суткам (в 4.3 раза

при сравнении с интактным контролем, в 6 раз при сравнении с 7-ми сутками,  $p < 0.05$ ). Преходящее увеличение количества нейронов, экспрессирующих GPC4, в острый период ТСМ на уровне сегментов L3–4 может быть связано с реакцией на повреждение, направленной на поддержание или восстановление функций спинного мозга, с последующим снижением экспрессии GPC4 в хроническом периоде из-за истощения компенсаторных механизмов.

*Пластинка VIII.* На уровне сегментов L3–4 поясничного отдела на обоих сроках наблюдения не выявлено изменение количества PARV+ и OPN+ нейронов (рис. 3а, б). Для GPC4+ нейронов, так же как и в пластинке VII, установлено значительное уменьшение их количества (рис. 3с) к 60-м суткам эксперимента (в 4.6 и 5 раз при сравнении с интактным контролем и показателем на 7-е сутки соответственно,  $p < 0.05$ ).

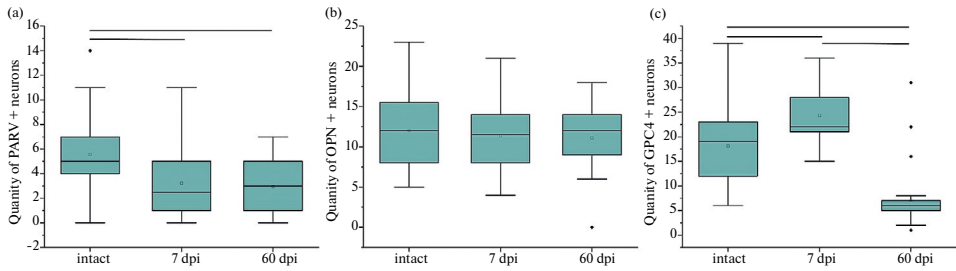


**Рис. 3.** Количество (а) PARV+, (б) OPN+, (с) GPC4+ нейронов в VIII пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury);  $p < 0.05$ , тест Крускала – Уоллиса.

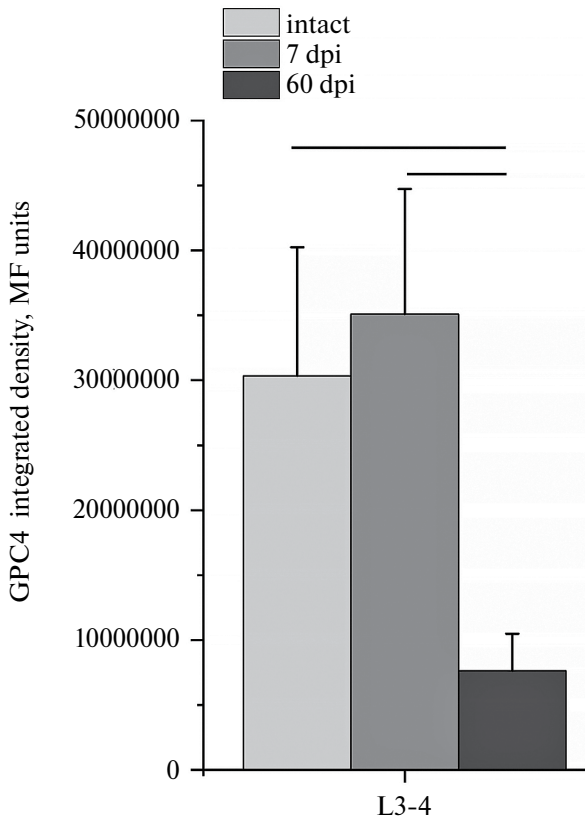
Стабильность количества PARV+ и OPN+ нейронов в пластинке VIII может свидетельствовать о том, что мотонейроны заднелатерального и заднемедиального ядер, а также нейроны собственного ядра переднего рога в отдаленном от эпицентра травмы поясничном отделе длительно поддерживают свой фенотип и менее чувствительны к повреждению в острой и хронической фазе ТСМ. Значительное уменьшение количества нейронов, экспрессирующих GPC4, к 60-м суткам на уровне сегментов L3–4 указывает на возможные долговременные изменения в их функционировании.

*Пластинка IX.* В пределах данной пластинки на уровне сегментов L3–4 установлено уменьшение в ~1.8 раза ( $p < 0.05$ ) количества PARV+ нейронов как на 7-е, так и на 60-е сутки после нанесения травмы (рис. 4а). В этом материале так же, как и в пластинках VII и VIII, изменения в количестве OPN+ нейронов не выявлены (рис. 4б). Количество GPC4+ нейронов возрастало на 7-е сутки (в 1.3 и 3.4 раза при сравнении с интактным контролем и показателем на 60-е сутки соответственно) и существенно снижалось на 60-е сутки после повреждения (в 2.5 и 3.4 раза при сравнении с интактным контролем и 7-ми сутками соответственно) (рис. 4с).

Уменьшение количества PARV+ нейронов в пластинке IX может быть связано с повреждением или дисфункцией как крупных альфа-мотонейронов, так и малых гамма-мотонейронов в переднемедиальном и переднелатеральном ядрах. Это указывает на значительное влияние травмы на эти популяции нейронов. Отсутствие изменений в количестве OPN+ нейронов во всех исследуемых пластинках свидетельствует о том, что данные нейронные популяции остаются стабильными и могут быть в меньшей степени подвержены повреждению, реализуя эффективные механизмы компенсации.



**Рис. 4.** Количество (а) PARV+, (b) OPN+, (c) GPC4+ нейронов в IX пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury);  $p < 0.05$ , тест Крускала – Уоллиса.

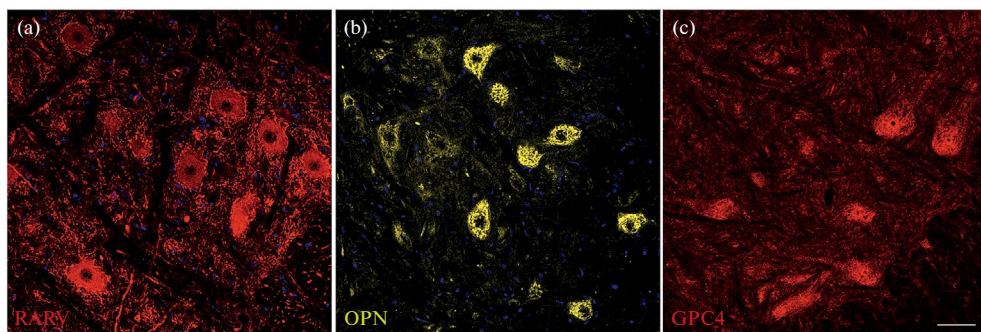


**Рис. 5.** Изменение интегральной интенсивности флуоресценции (единицы MIF – mean intensity of fluorescence) GPC4 в передних рогах поясничного отдела (сегменты L3–4) спинного мозга интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury);  $p < 0.05$ , тест Тьюки.

Аналогичная, как и в других пластинках в передних рогах спинного мозга, динамика увеличения количества GPC4+ нейронов на 7-е сутки, а затем их значительное снижение к 60-м суткам может отражать адаптивные изменения нейронов этих популяций в ответ на травму.

*Интегральная интенсивность* флуоресценции GPC4 в передних рогах спинного мозга в сегментах L3–4 демонстрирует тенденцию к некоторому увеличению на 7-е сутки и значительно снижается к 60-м суткам (в 3.9 и в 4.6 раз по сравнению с интактным контролем и показателем на 7-е сутки соответственно,  $p < 0.05$ ) (рис. 5).

Таким образом, полученные данные по экспрессии PARV (рис. 6а), OPN (рис. 6б) и GPC4 (рис. 6с) в нейронах конкретных популяций в разных пластинках передних рогов серого вещества в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга свидетельствуют о сложных механизмах адаптации нейронов различных популяций в этом отделе серого вещества.



**Рис. 6.** Иммунофлуоресцентный анализ. Визуализация экспрессии (а) PARV (красным), (б) OPN (желтым) и (с) GPC4 (красным) в передних рогах (пластинка IX) поясничного отдела (сегменты L3–4) спинного мозга крысы. Масштаб: 50 мкм (20×).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отдаленное повреждение – это многофакторное явление, в котором такие компоненты, как нейровоспаление, окислительный стресс, эксайтотоксическое повреждение, уменьшение количества синапсов и снижение экспрессии маркеров активности нейронов, проявляются в определенные сроки. Каждый из этих компонентов и взаимодействие между ними влияют на поведение нейральных клеток и функциональные результаты.

В пластинках VII и IX в острую и хроническую фазу ТСМ нами показано уменьшение количества PARV+ нейронов, что может указывать на снижение связывания кальция в нейронах отдаленного от эпицентра повреждения поясничного отдела спинного мозга. Эти изменения могут совпадать со снижением экспрессии маркеров активности нейронов в отдаленном отделе, например, таких как *c-fos* и *Ca*/кальмодулин-зависимая-протеинкиназа II альфа (*CaMK2a*) [40]. Сдвиги в количестве иммунопозитивных нейронов можно надежно зарегистрировать при достаточно выраженном их количестве в определенном объеме ткани. Численность популяции образующих комиссуральные и propriospinalные связи PARV+ нейронов в пластинке VIII менее многочисленна по сравнению с другими пластинками, например, V–VI [17]. Можно предположить, что именно поэтому нам не удалось зарегистрировать сдвиги в количестве PARV+ нейронов в пластинке VIII. На важность поддержания экспрессии PARV для выживания



нейронов указывают данные исследований на mSOD1 мутантных мышях с моделью БАС. На этой модели сверхэкспрессия PARV значительно сдерживала гибель мотонейронов, наблюдаемую в результате эксайтотоксического повреждения [41]. Методом гибридизации *in situ* показана активная экспрессия мРНК гена *Parv* в пуле резистентных к БАС мотонейронов. При этом в мотонейронах чувствительных к БАС популяций измеримая экспрессия PARV не обнаружена. Для других Ca-связывающих белков, таких как кальбиндин D28K, кальретинин и кальмодулин, установлен одинаковый уровень экспрессии в различных моторных пулах. Эти наблюдения позволяют рассматривать PARV в качестве специфического маркера резистентных к БАС мотонейронов и формируют представление о механизмах устойчивости мотонейронов к дегенерации [42]. Таким образом, наши данные по снижению экспрессии PARV в нейронах пластинок VII и IX могут указывать на повышение риска их повреждения и усиления дефицита двигательной функции.

Мы впервые изучили характер экспрессии OPN в нейронах отдаленного от эпицентра травматического повреждения поясничного отдела спинного мозга. Во всех изученных пластинках в передних рогах серого вещества нами не отмечены сдвиги в количестве OPN+ нейронов как в острой, так и в хронической фазе ТСМ. Полученные в настоящей работе данные можно интерпретировать как то, что посттравматические сдвиги в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе могут не затрагивать всю популяцию нейронов в передних рогах, и если они проявляются, то только в поздние сроки ТСМ.

Показанное в пластинке IX в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга увеличение количества GPC4+ нейронов в остром посттравматическом периоде может отражать реакции восстановления функции нейронных сетей. Эти данные можно рассматривать в ключе позитивной приспособительной реакции нейронов в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга. Оценка этой реакции как позитивной основана на данных о связывании заякоренного на поверхности нейрона GPC4 с различными молекулами, обладающими нейротрофической активностью и стимулирующими нейрорегенерацию, такими как нейротрофические факторы [43] и синаптогенные молекулы [32].

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ч. Ю. А. и М. Я. О.), сбор данных (Т. О. Н., К. И. М.), обработка данных (Т. О. Н., К. И. М.), написание и редактирование манускрипта (Ч. Ю. А., К. И. М., Т. О. Н., М. Я. О.).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23–25–00002), <https://rscf.ru/project/23–25–00002>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 43 от 24.10.2023 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Czeiter E, Pal J, Kovacs E, Bukovics P, Luckl J, Doczi T, Buki A* (2008) Traumatic axonal injury in the spinal cord evoked by traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25: 205–213.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0331>
2. *Freund P, Curt A, Friston K, Thompson A* (2013) Tracking changes following spinal cord injury: Insights from neuroimaging. *Neuroscientist* 19: 116–128.  
<https://doi.org/10.1177/1073858412449192>
3. *Bisicchia E, Latini L, Cavallucci V, Sasso V, Nicolini V, Molinari M, D'Amelio M, Viscomi MT* (2017) Autophagy Inhibition Favors Survival of Rubrospinal Neurons After Spinal Cord Hemisection. *Mol Neurobiol* 54: 4896–4907.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0031-z>
4. *Chelyshev Y* (2022) More Attention on Segments Remote from the Primary Spinal Cord Lesion Site. *Front Biosci – Landmark* 27: 235.  
<https://doi.org/10.31083/j.fb12708235>
5. *Nardone R, Trinka E* (2015) Reorganization of spinal neural circuitry and functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 10: 201–202.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.152368>
6. *Smith AC, Knikou M* (2016) A Review on Locomotor Training after Spinal Cord Injury: Reorganization of Spinal Neuronal Circuits and Recovery of Motor Function. *Neural Plast* 2016: 1216258.  
<https://doi.org/10.1155/2016/1216258>
7. *Yang B, Zhang F, Cheng F, Ying L, Wang C, Shi K, Wang J, Xia K, Gong Z, Huang X, Yu C, Li F, Liang C, Chen Q* (2020) Strategies and prospects of effective neural circuits reconstruction after spinal cord injury. *Cell Death Dis* 11: 439.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2620-z>
8. *Wang Y, Wu W, Wu X, Sun Y, Zhang YP, Deng LX, Walker MJ, Qu W, Chen C, Liu NK, Han Q, Dai H, Shields LBE, Shields CB, Sengelaub DR, Jones KJ, Smith GM, Xu XM* (2018) Remodeling of lumbar motor circuitry remote to a thoracic spinal cord injury promotes locomotor recovery. *Elife* 7: e39016.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.39016>
9. *Beauparlant J, Van Den Brand R, Barraud Q, Friedli L, Musienko P, Dietz V, Courtine G* (2013) Undirected compensatory plasticity contributes to neuronal dysfunction after severe spinal cord injury. *Brain* 136: 3347–3361.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awt204>
10. *Hou S, Duale H, Cameron AA, Abshire SM, Lyttle TS, Rabchevsky AG* (2008) Plasticity of lumbosacral propriospinal neurons is associated with the development of autonomic dysreflexia after thoracic spinal cord transection. *J Comp Neurol* 509: 382–399.  
<https://doi.org/10.1002/cne.21771>
11. *Dougherty KJ, Hochman S* (2008) Spinal cord injury causes plasticity in a subpopulation of lamina I GABAergic interneurons. *J Neurophysiol* 100: 212–223
12. *Matson KJE, Russ DE, Kathe C, Hua I, Maric D, Ding Y, Krynitisky J, Pursley R, Sathyamurthy A, Squair JW, Levi BP, Courtine G, Levine AJ* (2022) Single cell atlas of spinal cord injury in mice reveals a pro-regenerative signature in spinocerebellar neurons. *Nat Commun* 13: 5628.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33184-1>
13. *Antal M, Polgár E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P* (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 314: 114–124.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903140111>
14. *Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HHHW* (1994) Subpopulations of gabaergic neurons in laminae i-iii of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61: 123–132.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90065-5)
15. *Chakrabarty S, Shulman B, Martin JH* (2009) Activity-dependent codevelopment of the corticospinal system and target interneurons in the cervical spinal cord. *J Neurosci* 29: 8816–8827.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-09.2009>
16. *Ma X, Mirauccourt LS, Qiu H, Sharif-Naeini R, Khadra A* (2023) Modulation of SK Channels via Calcium Buffering Tunes Intrinsic Excitability of Parvalbumin Interneurons in Neuropathic Pain: A Computational and Experimental Investigation. *J Neurosci* 43: 5608–5622.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0426-23.2023>

17. *Veshchitskii A, Merkulyeva N* (2023) Calcium-binding protein parvalbumin in the spinal cord and dorsal root ganglia. *Neurochem Int* 171: 105634.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105634>
18. *Chen B, Li Y, Yu B, Zhang Z, Brommer B, Williams PR, Liu Y, Hegarty SV, Zhou S, Zhu J, Guo H, Lu Y, Zhang Y, Gu X, He Z* (2018) Erratum: Reactivation of Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations *Cell* 174(3):521–535.e13.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.050>
19. *Khalki L, Sadlaoud K, Lerond J, Coq JO, Brezun JM, Vinay L, Coulon P, Bras H* (2018) Changes in innervation of lumbar motoneurons and organization of premotor network following training of transected adult rats. *Exp Neurol* 299: 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.002>
20. *Antal M, Freund TF, Polgár E* (1990) Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 295: 467–484.  
<https://doi.org/10.1002/cne.902950310>
21. *Ren K, Ruda MA* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Rev* 19: 163–179.  
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
22. *Fahandejsaadi A, Leung E, Rahaii R, Bu J, Geula C* (2004) Calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in primate lower motor neurons. *Neuroreport* 15: 443–448.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-200403010-00012>
23. *Shaw PJ, Eggett CJ* (2000) Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Suppl* 247: 17–27.  
<https://doi.org/10.1007/s004150050553>
24. *Weng Y, Lu F, Li P, Jian Y, Xu J, Zhong T, Guo Q, Yang Y* (2024) Osteopontin Promotes Angiogenesis in the Spinal Cord and Exerts a Protective Role Against Motor Function Impairment and Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 49: E142–E151.  
<https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000004954>
25. *Bei F, Lee HHC, Liu X, Gunner G, Jin H, Ma L, Wang C, Hou L, Hensch TK, Frank E, Sanes JR, Chen C, Fagiolini M, He Z* (2016) Restoration of Visual Function by Enhancing Conduction in Regenerated Axons. *Cell* 164: 219–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.036>
26. *Misawa H, Hara M, Tanabe S, Niikura M, Moriwaki Y, Okuda T* (2012) Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *J Neurosci Res* 90: 732–742.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22813>
27. *Morisaki Y, Niikura M, Watanabe M, Onishi K, Tanabe S, Moriwaki Y, Okuda T, Ohara S, Murayama S, Takao M, Uchida S, Yamanaka K, Misawa H* (2016) Selective expression of osteopontin in ALS-resistant motor neurons is a critical determinant of late phase neurodegeneration mediated by matrix metalloproteinase-9. *Sci Rep* 6: 27354.  
<https://doi.org/10.1038/srep27354>
28. *Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD* (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–33.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>
29. *Litwack ED, Stipp CS, Kumbasar A, Lander AD* (1994) Neuronal expression of glypican, a cell-surface glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan, in the adult rat nervous system. *J Neurosci* 14: 3713–3724.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-06-03713.1994>
30. *Farhy-Tselnicker I, van Casteren ACM, Lee A, Chang VT, Aricescu AR, Allen NJ* (2017) Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron* 96: 428–445.e13.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.053>
31. *Kaur SP, Cummings BS* (2019) Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression. *Biochem Pharmacol* 168: 108–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.020>
32. *Kamimura K, Maeda N* (2021) Glypicans and Heparan Sulfate in Synaptic Development, Neural Plasticity, and Neurological Disorders. *Front Neural Circuits* 15: 595596.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.595596>
33. *Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, Barres BA* (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486: 410–414.  
<https://doi.org/10.1038/nature11059>

34. *Yuzaki M* (2018) Two Classes of Secreted Synaptic Organizers in the Central Nervous System. *Annu Rev Physiol* 80: 243–262.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121322>
35. *Lee E, Chung WS* (2019) Glial control of synapse number in healthy and diseased brain. *Front Cell Neurosci* 13: 42.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00042>
36. *Kabdeshe IM, Mukhamedshina YO, Arkhipova SS, Sabirov DK, Kuznecov MS, Vyshakalyuk AB, Rizvanov AA, James V, Chelyshev YA* (2022) Cellular and Molecular Gradients in the Ventral Horns With Increasing Distance From the Injury Site After Spinal Cord Contusion. *Front Cell Neurosci* 16.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.817752>
37. *McBride RL, Feringa ER* (1992) Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection. *Brain Res Bull* 28: 57–60.  
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90230-U](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90230-U)
38. *Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S* (2019) Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain* 12: 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-018-0422-3>
39. *García-Álías G, Torres-Espín A, Vallejo C, Navarro X* (2010) Functional involvement of the lumbar spinal cord after contusion to T8 spinal segment of the rat. *Restor Neurol Neurosci* 28: 781–792.  
<https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0549>
40. *Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S* (2019) Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain* 12: 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-018-0422-3>
41. *Spruill MM, Kuncl RW* (2015) Calbindin-D28K is increased in the ventral horn of spinal cord by neuroprotective factors for motor neurons. *J Neurosci Res* 93: 1184–1191.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.23562>
42. *Elliott JL, Snider WD* (1995) Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6: 449–452.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199502000-00011>
43. *Oikari LE, Yu C, Okolicsanyi RK, Avgan N, Peall IW, Griffiths LR, Haupt LM* (2020) HSPGs glypican-1 and glypican-4 are human neuronal proteins characteristic of different neural phenotypes. *J Neurosci Res* 98: 1619–1645.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.24666>

## Expression of Parvalbumin, Osteopontin and Glypican4 in Neurons of Lumbar Region Distant from the Epicenter of Traumatic Spinal Cord Injury

O. N. Tutova<sup>a</sup>, I. M. Kabdesh<sup>a, #</sup>, Ya. O. Mukhamedshina<sup>a, b</sup>, and Yu. A. Chelyshev<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>b</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>#</sup>e-mail: ikabdesh@gmail.com

Spinal cord injury (SCI) is manifested by pathologic changes in the areas significantly distant from the area of primary injury. In order to find new potential therapeutic targets to restore motor function, it is particularly relevant to identify the causes and mechanisms of these shifts in the lumbar spinal cord when injury occurs in the proximal spinal cord. On the model of dosed SCI the expression of Ca-binding protein parvalbumin (PARV), osteopontin (OPN) and glypican 4 (GPC4) in neurons of laminae VII, VIII and IX within segments L3–4 on 7 and 60 days of the experiment was studied. Laminas VII and IX show a decrease in the number of PARV+ neurons during the acute and chronic phase of SCI, which may indicate a decrease in calcium binding in ventral horn neurons at the level of segments L3–4. Decreased PARV expression in these neurons indicates an increased risk of their vulnerability and impaired motor function. The pattern of OPN expression in lumbar horn neurons distant from the epicenter of traumatic injury was studied for the first time. In all the studied laminae in the ventral horns of the gray matter, we did not observe shifts in the number of OPN+ neurons both in the acute and chronic phases of SCI. In lamina IX of the lumbar spinal cord, we found an increase in the number of GPC4+ neurons in the acute posttraumatic period, which can be regarded as a key positive adaptive reaction of neurons in the lumbar spinal cord remote from the epicenter of injury. The assessment of this reaction as positive is based on the data on the binding of GPC4 anchored on the neuron surface to various molecules with neuroprotective activity and stimulating neuroregeneration.

*Keywords:* spinal cord injury, remote injury, parvalbumin, osteopontin, glypican