



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för Kvinnors och barns hälsa

Biomedicinska analytikerprogrammet

Examensarbete 15 hp, vt 2013

**Immunohistochemical evaluation of antibodies for staining of
mouse spinal cord and mouse neuronal cells**

Per Alsén

Handledare: Britt-Marie Andersson, Nikos Schizas, Nils Hailer

Avdelningen för kirurgiska vetenskaper, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Abstract

Around 58 000 patients search hospital care each year due to injuries on the central nervous system, CNS. After a traumatic event, a secondary insult may occur, which is mainly due to an inflammatory response involving cytokine based activation of microglial cells and astrocytes. The protective cytokines, IL-1RA and NT-3, have been shown to inactivate this process. This thesis is focused on preparation, fixation and staining of spinal cord and neuronal cells from mice. Immunohistochemistry including visualization in confocal- and fluorescence microscopes used to detect staining. The primary antibodies we used for marking different structures were NF-L (neural filament), IB4 (microglial cells), GFAP (astrocytes), Neu N (neural cores), Chat (cholinergic neurons) and 5-HT (axons). For culture, two different matrix substrates were used, hyaluronic acid and collagen. Cells were cultured with or without added IL-1RA and NT-3, to study neuronal survival through natural degeneration over a period of time and then later to be used as a method for studying the inflammatory response induced in vitro by NMDA. The result showed good staining qualities for all the antibodies except Chat. In two cell cultures we added IL-1RA and NT-3, preliminary data showed possible increased neuronal survival. The tested antibodies can be used to evaluate the results from IL-1RA and NT-3. Further studies are needed to improve the staining with Chat.

Keywords: NF-L, IB4, GFAP, NeuN, Chat, 5-HT, astrocytes, microglial cells

Introduktion

Kroppens nervsystem är uppdelat i CNS (centrala nervsystemet) och PNS (periferia nervsystemet). CNS består av långa nervtrådar från hjärnan som går ut i ryggmärgen och vidare ut i kroppen där det övergår till PNS. Det sägs att CNS är det mest komplexa organet vi har i kroppen, där vi har vårt medvetande, vår personlighet samt minnet. Sammanlagt finns över hundra miljarder nerver som bygger samman hela CNS. CNS får sin information från PNS och bearbetar denna i hjärnan. Informationen mellan PNS och CNS kan gå tre olika vägar. Sensoriska nervsystemet (information om de inre organen samt tryck, värme och smärta), sammanbindande nerver (utgör 99 % av de sammanlagda nerverna, de binder samman ryggmärg med hjärna) och motoriska nerverna (som styr rörelserna från muskler samt fungerandet av körtlar). De motoriska nerverna har sina cellkroppar i CNS medan den sensoriska delen har sina cellkroppar ute i kroppen i form av ganglier. Informationen från de sensoriska och motoriska nerverna kommer framförallt till framhjärnan där den bearbetas. Den faktiska informationsbehandlingen sker därefter i hjärnbarken som sedan skickar informationen via ryggmärgen ut i kroppen. De sensoriska och motoriska nervcellerna består av neuroner som skickar informationen med hjälp av elektroniska impulser. Axoner och dendritter driver impulserna fram till hjärnan, samt tillbaka ut igen. Runt neuronerna finns det stödjande och skyddande celler som astrocyter och mikroglia-celler.

Det finns många sätt att preventivt minska risken för huvudtrauma, t ex genom att använda hjälm eller ha en airbag i bilen, men skulle en hjärnskada ändå inträffa är det risk för skador på hjärnan till följd av traumat, d.v.s. den primära skadan. Efter den primära skadan och beroende av många faktorer som t ex traumats storlek, skydd och patientens ålder kan hjärnan drabbas av nya skador till följd av den efterföljande inflammationen och/eller blödningen, detta kallas för den sekundära skadan. Vad som då händer är att volymen i hjärnan ökar,

vilket gör att trycket på neurala cellerna ökar och det uppstår en syrebrist som leder till nervcellsöd. Detta kan man försöka förhindra eller delvis lindra genom att dels skapa mera utrymme genom att operera bort skallbenet eller tappa hjärnan på likvor och dels genom att minska metabolismen för nervcellerna vilket leder till minskad inflammation och ett lägre syrebehov då aktiviteten är lägre. Metabolismen kan man minska med hjälp av hypotermibehandling, d.v.s. man kyler ner hjärnan och därmed minskas aktiviteten eller genom respiratorbehandling med hyperventilation, vid nedsövning är aktiviteten och metabolismen lägre samt genom snabbare andning minskas CO₂ och den anaeroba förbränningen[1].

Vid inflammation på CNS är det bevisat att astrocyter förhindrar eller försvårar regeneration av nervceller efter skada på ryggmärg och hjärna. Mikroglia-celler fungerar som fagocyter av bakterie medan astrocyter bygger upp och ger näring åt CNS. Den primära skadan kan man inte göra så mycket åt om det är ett trauma, men den sekundära skadan vill man få en bredare uppfattning om, varför inflammation efter en skada ger en sekundär skada.

Trauman som involverar CNS är de vanligaste orsakerna till död eller dysfunktion av CNS. År 2010 drabbades ca 58 000 personer i Sverige av huvudskada som föranledde besök på sjukhus¹). Trots att CNS ligger väl skyddad under benstruktur i kraniet och kotorna i ryggraden, kan det ibland uppstå skador på CNS i form av trauma orsakat av yttre våld. Dessa skador kan vara svåra att reparera, och är ibland oreparerbara, vilket kan ge men för resten av livet. Skador kan också orsakas av sådana sjukdomar som ger en kronisk inflammation som t.ex. MS (multipel skleros). Akuta inflammationer orsakat av t.ex. viruset Herpes Simplex (typ 1) leder till encefalit, vilket oftast drabbar barn.

¹<http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/18491/2011-11-18.pdf>

Andra orsaker till skador på CNS är oförklarlig nerbrytning av nerver i hjärnan som vid Alzheimer's sjukdom eller olika autoimmuna sjukdomar.

Mikroglia-celler är en del av kroppens försvar av nervsystemet och har som uppgift att ta bort parasiter, denna cell omvandlas vid aktivering till en makrofag och producerar cytokiner.

Mikroglia-celler medverkar vid t.ex. autoimmun sjukdom som MS eller vid den inflammation som uppstår sekundärt efter ett trauma. I olika studier har man tittat på orsaker till aktivering av mikroglia-celler[2,3]. Den ena studien visar att det även på transmigration av B-lymfocyter till den inflammationsaktiva platsen, där de utvecklas till plasmaceller och skapar antikroppar mot de egna myelinskeletten[2].

Den idag använda metoden för prevention av inflammation vid sekundär skada är att ge methylprednisolone tidigt efter traumat. Den bästa metoden för att få en bild av den primära skadan är med hjälp av en MRT-undersökning (magnetresonanstomografi). Där tittar man efter synbara sjuka förändringar eller kompressioner av CNS. Studier med biomarkörerna GFAP (Glia fibrillary acidic protein) och NF-L (Neurofilament light chain) har visat på bra korrelation mellan skada på CNS och ökning av de ämnen som visas av biomarkörerna, vad som synliggörs kommer att förklaras närmare senare[4].

Monocyter kan gå över blodhjärnbarriären under vissa fysiologiska tillstånd vilket har undersökts i en rad experiment[3]. I vävnaden omvandlas dessa monocyter till makrofager vid inflammation som är fagocyterande celler och frigör en rad olika cytokiner som IL-1, IL-6 samt TNF- α . IL-1 producerad av makrofager anses vara den huvudsakliga cytokinen som aktiverar mikroglia-celler och astrocyter, ger ökad cellproliferation, utsöndring av toxiska ämnen och migration till den skadade delen i CNS[4]. Proliferation sker först efter 24 tim efter skadan och når sin topp efter 3-5 dagar. Vid skada frigör mikroglia-cellerna toxiska ämnen i form av proinflammatoriska cytokiner, proteaser och NO (kväveoxid). Det sker också en förändring och reglering av mikroglia-cellernas jonkanaler (K^+ kanaler, Cl^- kanaler och Ca^{2+}

beroende K^+ kanaler) vilka är viktiga för aktivering och migration av mikroglia cellerna[3].

Det som även produceras av makrofager vid skada av CNS är antagonisten IL-1RA, vilken är inhibitor och hämmare av aktivering hos mikroglia celler och astrocyter[5].

Medicinen MMF (Mykofenolate mofetil) som inhiberar ett enzym i purinmetabolismen, IMPDH (inosin monofosfat dehydrogenas), har i en studie visats vara starkt förknippad med cellulär proliferation. MMF bidrar även till att makrofager inte frigör samma mängd av proinflammatoriska cytokiner som IL-1. IL-1RA och MMF har en positiv skyddande effekt på neuroner, genom sin bromsande effekt på proliferationen av mikroglia celler och astrocyter[6].

Det har gjorts studier på om granulocyter samt makrofager också kan skydda nerver i CNS med hjälp av GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) samt reparera CNS och verka för neural överlevnad[7]. Det kan verka lite motsägelsefullt att makrofager kan verka både för och emot neural överlevnad, men då studier i ämnet inte är så långt framskridna, bör inte förhastade slutsatser dras. Ett annat viktigt protein är NT-3 (Neurofin-3) som har en skyddande, nybildande och differentierande effekt av neuron, samt ger en ökad proliferation hos mikroglia celler[3].

I detta arbete utförs experimenten med antikroppar in vitro på muspreparat från ryggmärg, innehållandes vävnad och celler. Med hjälp av immunohistokemi provades dessa antikroppar (NF-L, IB4 (isolectin B4), GFAP, NeuN (Neuronal specific nuclear protein), Chat (Choline acetyltransferas) och 5-HT (serotonin) som binder in till olika strukturer av mikroglia celler, astrocyter och neuroner. NF-L är ett cytoskelettalt protein i intermediärfilamenten. NF-L är förhöjt hos personer med degenerativa sjukdomar, exempelvis Alzheimers sjukdom, och en antikropp riktad mot detta protein kan användas som biokemisk markör. IB4 binder in RET (receptor tyrosine kinase receptorn) hos mikroglia celler och fungerar som en neurotrofisk faktor hos dessa. Antikroppar mot IB4 används därför för att markera in mikroglia celler. GFAP är huvudproteinet i intermediärfilament III hos astrocyter. GFAP-antikroppen binder in

dessa filament och kan på så sätt skilja mellan differentierade astrocyter och mikroglia-celler. NeuN är lösligt nukleärt protein som binder in DNA och antikropp riktad mot detta protein används för att se neurala kärnor. 5-HT (serotonin) är en endogen neurotransmittor som utsöndras via axoner och binder in receptorer på mottagarnervcellen. En antikropp mot 5-HT används för att märka in axoner hos nervcellerna. Chat är ett enzym som tillverkas inuti nervcellskroppen. Denna förflyttas sedan till nerven och används för att bilda neurotransmittorn acetylkolin. Antikroppen riktad mot chat är till för att märka in kolinerga neuroner. Dessa inmärkte strukturer visualiseras med sekundär antikropp i mikroskop (konfokal eller fluoroscensmikroskop). Denna inmärkningsmetod kan senare användas när man in vitro på inducerad inflammation vill jämföra uttryck med och utan inflammationshämmande ämnen.

Just nu pågår en större studie, vilket examensarbetet är ett bidrag till, där studeras vävnadssnitt från vildtypsmöss som skadats excitotoxiskt med hjälp av NMDA, ifall det är någon skillnad i neuronal överlevnad efter den sekundära skadan vid tillsats av IL1-RA och/eller NT3 och där vi använt de infärgningsmetoder som studerats i examensarbetet.. Syftet med examensarbetet är utvärdera olika infärgningsmetoder med olika antikroppar (NF-L, IB4, GFAP, Neu N, Chat och 5-HT) för att senare med hjälp av dessa metoder kunna studera skador som uppstått på CNS genom inflammation, orsakat av ischemi eller trauman, samt att testa dessa infärgningsmetoder på celler som odlats med eller utan IL1-RA och NT-3.

Material och metod

Studiematerial för immunhistokemisk färgning

Material för studierna erhöles från tre olika typer av möss, vildtypsmöss samt möss framavlade med grön eller röd fluorescens. Dessa var mellan 8-10 dagar för att ryggmärgen då ej hunnit växa fast och det var därför enkelt att kunna få ut ryggmärgen med en spruta. Därefter direktfixerades ryggmärgen i fixeringsmedel varefter de fryssnittades eller odlades upp som kulturer. För kulturer snittades ryggmärgen från vildtypsmöss med ”Chopper” (The Mickle laboratory engineering co, LTD) i bitar på 500µm som fick stå olika lång tid i inkubator på HA- gel (hyaluronsyra) eller kollagen med eller utan inflammationsinhiberande ämnen (IL-1RA och NT-3). Anledningen till att det används två olika geler var att närmare studera skillnader i bevaringen av cellkulturerna och se ifall någon gel fungerar bättre än den andra. Odlade kulturer fixerades sedan och antingen fryssnittades eller lades som helkultur på objektglas. Snitten samt kulturerna färgades in med primära och sekundära antikroppar mot olika valda strukturer. Etikprovning har gjorts med nr C346/11 in vitro studier på neuronal överlevnad och regeneration av ryggmärgsskador.

Framtagning av helkultur och fryssnitt

För helkulturerna och fryssnitten användes vildtypsmöss 8-10 dagar gamla. Först avlägsnades huvudet med steril sax. För att få ut ryggmärgen lades musen på mage och nålar sattes i armar och ben för att sträcka ut musen. Efter det klipptes huden upp längs hela ryggraden, var efter ryggraden klipptes av lite ovanför svansen. Sedan lades ett snitt på båda sidorna längs med ryggraden. Sprutan med prepareringsmedium fördes in i ett litet hål i ryggraden, vätskan sprutades in och ryggmärgen kom ut i huvudändan och lades i rör med prepareringsmedium, som sedan ställdes på is. För att få helkulturer för odling snittades ryggmärg med hjälp av

Chopper i 500µm bitar på filter som sedan särades på i petriskålar med prepareringsmedium. Ryggmärgsbitarna sögs upp ur prepareringsmedium med pasturpipett en och en, placerades i filterkorgarna med kollagen eller HA-gel med IL-1RA, NT-3, 3-5skivor/filterkorg. För att direktfixera materialet så lades ryggmärgen direkt i fixeringsmedium, för att sedan frysas in och sedan snittas.

Helkulturodling

Vi började med att göra prepareringsmedium 100ml (100ml MEM (Minimum Essential Medium) (SVA) + 1g glutamin (Sigma) pHvärdet justerades till 7,35) och odlingsmedium 100ml(50ml MEM + 25ml hästserum (Sigma) + 25ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (LifeTechnologies Corporation) + 0,1mg insulin (Sigma) + 0,08mg vitamin C (Sigma) + 240mg glukos (Sigma) + 2ml Pest (Penicillin streptomycin) (SVA)). Prepareringsmedium användes för att få fram ryggmärgen och som mellanlagring innan ryggmärgen lades i filterkorgarna (Becton Dickson France 353090). I filterkorgarna lades antingen en hinna av kollagen (0,8ml kollagen (BD Biosciences lot nr 23411) + 0,2ml DMEM (Dulbecco's MEM (SVA) + 4µl 7.5% sodium bikarbonate solution (7.5g/100ml sterilt MQ vatten)) eller HA-gel. Mellan filterkorgarna och sexhålsplattans brunnar fördes 2ml vätska/brunn, därefter tillsattes 4 olika medium som här beskrivs. Endast odlingsmedium, 6st kulturer inkuberades i 2 dagar, 6st kulturer inkuberades i 4 dagar och 6st kulturer inkuberades i 6 dagar. Odlingsmedium + IL-1RA (100ng/ml) 6st kulturer inkuberades i 2 dagar, 6st kulturer inkuberades i 4 dagar, 6st kulturer inkuberades i 6 dagar. Odlingsmedium + NT-3 (50ng/ml) 6st kulturer inkuberades i 2 dagar, 6st kulturer inkuberades i 4 dagar, 6st kulturer inkuberades i 6 dagar. Odlingsmedium + IL-1RA + NT-3. 7st kulturer inkuberades i 2 dagar, 7st kulturer inkuberades i 4 dagar, 6st kulturer inkuberades i 6 dagar.

Fixering av helkultur och fryssnitt

Till fixering användes 0,2M PB (fosfat buffert) (22,72g Na₂HPO₄ + 5,44g KH₂PO₄ till 1000ml vatten, pH 7.35 – 7.40). Av PB lösningen användes 100ml som blandades med 4g paraformaldehyd + 9,75ml 2% pikrinsyra + 100µl glutaraldehyd. Av fixering ett togs 2ml till varje brunn som sedan fick stå i 15min. Därefter tvättades brunnarna med 0,1M PB, 3 x 10min, 2ml till varje brunn. Preparaten postfixerades i 60min med fixering två (100ml 0,2M PB + 4g paraformaldehyd + 9,75ml 2% pikrinsyra) 2ml till varje brunn. Sedan sköljdes preparatet med 0,1M PB i 60min. 2ml Sukroslösning tillsattes och byttes ut varje dag tills pikrinsyra gula färgen hade försvunnit, kulturerna förvarades i kylskåp i 4°C under tiden. Därefter påbörjades immunohistokemisk infärgning.

Infärgning av helkultur

Kulturerna 74st i filterkorgar delades upp och överfördes en och en i olika brunnar till flera 24hålsplattor. Dessa kulturer hade legat i fyra olika odlingsmedium som beskrivits tidigare. Därefter sköljdes kulturerna i tvättbuffert (PBS + 0,1% triton) och fick stå 10-60 min. Vätskan sögs ur med pasteurpipett.

Blocklösning (27ml 2% BSA i PBS+0,3% triton (50:50) med 3 ml getserum för 10% styrka) tillsattes med pipett i 74 brunnar med 250µl/brunn och fick stå i 30min i rumstemperatur på skak. Därefter sögs vätskan upp med pasteurpipett och primär antikroppslösning ett tillsattes med 250µl/brunn: Primär AK (antikroppslösning) 1= Anti- Neurofilament L, (Millipore AB9568) späds 1:500 som inkuberas sedan i rumstemperatur på skak 24tim. Efter inkubationstid sögs AK 1 ur alla brunnar och kulturerna i botten av brunnen lämnades kvar. Sedan tillsattes tvättbuffert till brunnarna som sedan fick stå på skak i en timme (tvättsteget upprepades två gånger till). Därefter tillsattes sekundär antikropp (anti-kanin gjord i get biotinylatet (Vector BA-1000) vilket späddes med BSA (2% BSA i PBS+0,3% triton (50:50))

1:250. Det tillsattes 250µl av antikroppsspädningen till varje brunn som fick stå på skak i rumstemperatur över natt.

Nästa dag tömdes brunnar på sekundär antikropp och sedan tvättades kulturerna med tvättbuffert 30min på skak. Därefter tvättades kulturerna en gång under 30min och ytterligare en gång under 60min. För grön motfärgning användes dylight streptavidin (Vector sa-55488 grön) 74 brunnar vilket späddes med PBS 1:50. Dylight lösningen tillsattes i brunnarna som fick stå på skak 2tim i. Brunnarna tvättades sedan med tvättbuffert 3 gånger 1tim vardera på skak. Sedan monterades kulturerna på objektglas (Thermo scientific menzel-gläser lot 062910-9) med Vectashield (Vector Laboratories Inc. Burlingane CA.94010). Vid IB4 helkulturinmärkning användes en metod med färre steg, först en tvätt i 60min sedan blockerades kulturerna med blockeringsbuffert i 30min. Därefter tillsattes IB4 spädd i triton 0,3% 1:20, inkuberades sedan under skak i 24tim. Sedan tillsattes daylight koncentration 1:50. Slutligen tvättades kulturerna i 60min x3 i tvättbuffert och monterades med Vectashield. Detekteringen gjordes genom konfokalmikroskop.

Infärgning av fryssnitt

Till infärgningen användes 10st glas med två kulturer på varje glas från frysen -70/-20°C. Glasen ställdes i tvättbuffert i kyvett i 5min och placerades sedan i fukt-kammare. Blockering utfördes med blockeringsbuffert utspädd med en del gets serum + nio delar spädningbuffert (2% BSA i PBS+0,3% triton (50:50)). Med automatpipett droppades sedan 50µl blockeringsbuffert på varje kultur, som sedan fick stå i fukt-kammare i 30min. Därefter tillsattes fem olika antikroppslösningar till kulturerna, varje lösning användes till fyra kulturer som fick 100µl var. Antikroppslösningarna var Neurofilament L, NeuN (Rabbit polyclonal) (Millipore ABN78) som späddes 1:500 med spädningbuffert. De övriga tre antikropparna var Chat (Novus NB 100-89724) som späddes, 1:2000, 1:2500, 1:5000, GFAP (Abcam ab 7260)

(Glial Fibrillary Acidic Protein) som späddes 1:2000 och till sist 5-HT (Immunostar 20080) som späddes 1:50. Kulturerna inkuberades i 24tim rumstempererad fukt-kammare utom NeuN som stod i 4°C. Chat testades även med inkuberingstid i 48-,72- och 96tim för de olika spädningarna. Nästa dag tvättades glaset i tvättbuffert 3 x 5min. Sekundärantikropp 100µl tillfördes därefter till varje kultur som placerades i fukt-kammare i 30min. Sedan tvättades glaset igen 3x5min, varefter 50ul dylight streptavidin droppades på varje kultur som sedan inkuberades i fukt-kammare i 30min. Slutligen tvättades glaset av i tvättbuffert igen 3x5min sköljdes av i MQ vatten och monterades med Vectashild. Detekteringen gjordes i fluorescensmikroskop.

Resultat

I denna studie ville vi undersöka hur de olika antikropparna NF-L, IB4, GFAP, NeuN, Chat och 5-HT färgade in olika strukturer i neuroner, mikroglia-celler och astrocyter på helkultur och fryssnitt från ryggmärg på möss.

Infärgning av NF-L

Infärgning med NF-L på obehandlade celler i och celler behandlade 6 dagar, båda i helkultur med IL-1RA och NT-3 syns infärgat grönt neurofilament tätt packad över hela figuren, figur 1A och 1B. Det var ingen skillnad i infärgning mellan behandlade och obehandlade celler. När NF-L används på obehandlat fryssnitt syns i figur 1C att röda neurofilament färgas in, mest i kanterna, men också spritt i hela figuren.

Infärgning av IB4

På obehandlade celler som odlats i 6 dagar syns i figur 1D infärgade gröna mikroglia-celler, infärgade med IB4, som stråk över hela figuren.

Infärgning av GFAP

Färgning med antikroppen GFAP på obehandlat fryssnitt i figur 2A, visar röd infärgning i filament från astrocyter i utkanten av vävnaden. Infärgningen ses huvudsakligen som membranbunden. Denna antikropp testades inte på celler.

Infärgning med NeuN

För antikroppen NeuN på obehandlat fryssnitt i figur 2B ser vi neurala kärnor färgade rött utspritt över hela preparatet. Ingen infärgning sågs i cytoplasma eller membranbundet.

Färgning av celler testades inte.

Infärgning av Chat

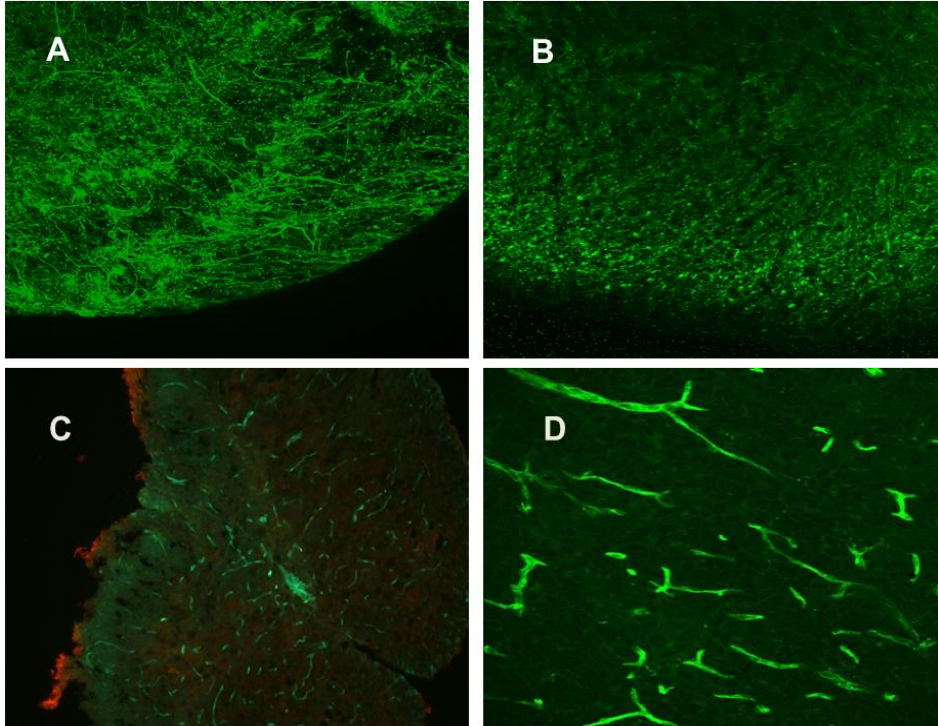
I försöken med Chat fick vi inte fram någon signal, oavsett koncentration på den primära antikroppen.

Infärgning av 5-HT

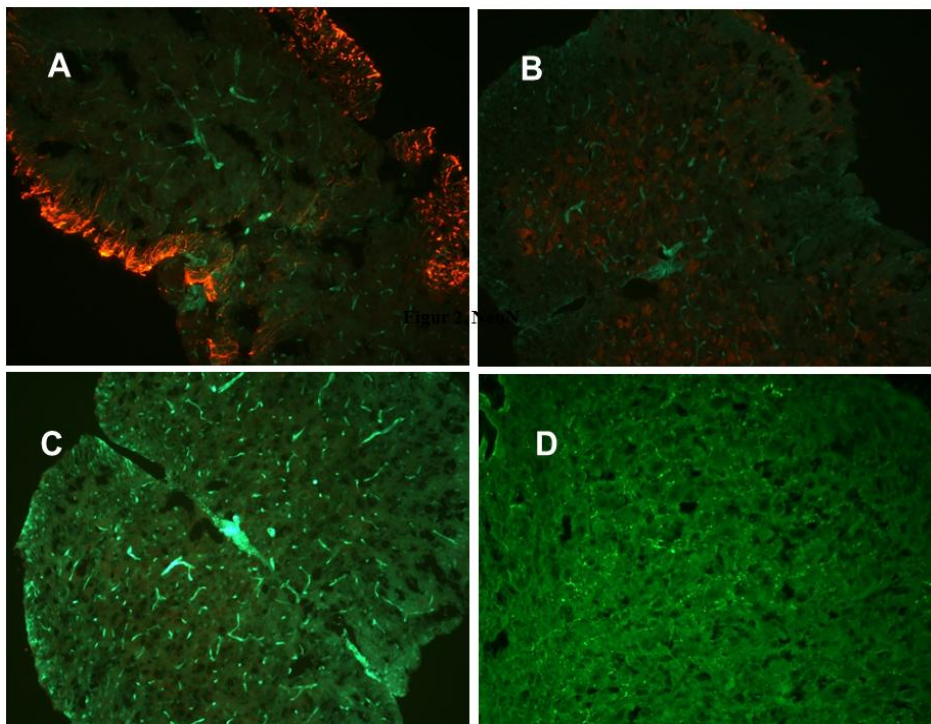
Färgning med antikropp mot neurotransmittorn 5-HT på obehandlat fryssnitt i figur 2D visar axoner där det lyser en starkt positiv grön signal, den svagare positiva gröna signalen är bakgrundsvävnad.

Odling av celler med IL-1RA och NT3

Till kulturerna som gjordes, finns det i nuläget inga resultat förutom två odlingar (figur 1A och 1B), där preliminära data kan tyda på att odling med IL-1RA och NT-3 ökar överlevnaden.



Figur 1. Immunohistokemisk infärgning av celler (A) NF-L kontroll, (B) NF-L med IL-1RA + NT-3 (C) NF-L (mus med grön autofluorescens) och (D) IB4. Samtliga bilder utom 1C är tagna med konfokalmikroskop.



Figur 2. Immunohistokemisk infärgning av fryssnitt hos möss med grön autofluorescens (A) GFAP, (B) NeuN, (C) Chat och (D) 5-HT. Bilder tagna med fluorescensmikroskop.

Diskussion

I denna studie testades olika antikroppar (NF-L, IB4, GFAP, NeuN, Chat och 5-HT) som senare skulle kunna användas för att studera den inflammatoriska process som kan inträffa vid den sekundära skadan i CNS. Fokus på examensarbetet låg på att få fram bra immunohistokemiska infärgningsmetoder. Fördelen att kunna märka in och visualisera de olika delarna av astrocyter och mikroglia-celler, vilka vi kan se i figuren är att man senare kan studera om ökning eller minskning av neural överlevnad i ryggmärg föreligger eller ej. Viktigt att undersöka är också hur aktivering av mikroglia-celler samt astrocyter kan inverka på skada av nervceller, om aktiveringen uteblir eller minskar med hjälp av antagonister som IL-1RA och NT-3. Resultatet för infärgningen av NF-L med tillsatt IL-1RA och NT-3, figur 1B, visar att detta är en immunohistokemiskt användbar metod som senare kan användas till den större studien. Huruvida det har skett en ökad neuronal överlevnad kan preliminära data tolkas som att det finns en ökad neuronal överlevnad. Tolkningen av resultaten görs av forskaransvariga, där cellerna noggrant har räknats på preparaten och där en första granskning visar en skillnad i antal neuron jämfört med kontrollgrupp 1A. Fler kulturer är infärgade, tillsammans med kulturer som utsatts för excitotoxisk stress via NMDA. Dessa resultat ska senare presenteras i den större pågående studien. Förhoppningen är att det ska ses skillnad i neuronal överlevnad i fler preparat. Infärgning som metod för att studera cellers överlevnad/död borde vara applicerbar även på andra typer av vävnader.

Detta har gjorts i ett tidigare experiment där man skadade neuronerna genom att tillsätta NMDA (N-metyl-D-aspartate) till kulturerna som låg in vitro och som hade tillsatt IL-1RA, NT-3 eller inget av dem. Med NMDA vill man åstadkomma en liknande skada som en inflammation kan ge efter en skada på CNS. Skadan märks sedan in med en fluorescensmarkör, PI (propidium iodide), som exempelvis kan färga in och visualisera

skadade celler[8].

NF-L är en bra antikropp och även här är användningsområdet att titta närmare på neuronernas utbredning och cellöverlevnad. Denna antikropp kommer att användas som rutininfärgning i framtida studier.

IB4 är en bra antikropp och denna metod kommer också att användas i framtida studier.

Denna antikropp har framgångsrikt tidigare använts i en studie från 2012[8], där man tittade på MMF, användes snittkulturer från hippocampus. Dessa skadades med NMDA och märktes sedan med IB4 som färgar in endotelet på mikroglia-celler. Man mätte framförallt skada efter 12 och 36 timmar, där man såg signifikant lägre aktivitet av mikroglia-celler med MMF-tillsatta kulturer jämfört mot de som saknade MMF. Högre andel apoptos av neuronceller visades efter skada, vid 24 och 72 timmar. Även här spelade MMF en viktig roll för att minska apoptos av neuronceller[8].

GFAP är en bra antikropp på fryssnitt då det tydligt med stark röd fluorescens se vart det bundit in, figur 2A. Antikroppen kommer användas i framtiden.

NeuN är en bra antikropp på fryssnitt, figur 2B och en bra markör med stark röd fluorescens lyser upp neuronernas utbredning och cellernas överlevnad kan enkelt räknas i framtida försök.

Den enda antikropp som inte visade goda resultat i fryssnitten, figur 2, är Chat. Där tanken var att se kolinerga neuroner, ses mikroglia-celler över hela figuren istället, figur 2C. Vid tidigare försök har man också stött på problem att få en bra Chat-inmärkning. Vi kommer att utveckla metoden Chat på helkultur genom att öka inkubationstiden till 96 timmar med den primära antikroppen för att märkas in och öka koncentrationen till 1:5000.

Antikroppen 5-HT, figur 2D, har inte använts som metod tidigare men de fina resultaten med starkt lysande grön färg gör att de nu kommer att bli rutin i framtida försök till den större studien för granskandet av excitotoxisk skada med eller utan IL-1RA och NT-3.

Tidigare studier har kommit fram till resultat som visar att det finns ett samband mellan IL-1 aktivering av celler och ryggmärgsskada[9,10]. Vid ischemiska strokerelaterade skador på neuroner i framför allt hjärnan har det påvisats att astrocyters aktivering leder till ökad retbarhet på neuronala celler[11,12]. Just fluorescensinmärkta möss är lämpliga för ändamålet eftersom det görs en motfärgad fluorescens för detektion av axontillväxt från neuroner. För tolkning av bilderna i denna studie krävs ett tränat öga samt god kunskap i vad man ser, och slutgiltig bedömning sker av forskaransvarig. Som preliminär analys kan en större överlevnad av neuroner antas i bild 1B (behandlad) än i bild 1A (obehandlad) där fler trasiga neuroner syns till. Forskningen utförs på djur så det är av vikt att man får ut relevant data för ändamålet och att det görs försök som för forskningen framåt på området. Anledningen till att det används djur till dessa försök är att det finns en stor likhet mellan mössens neuronala nätverk och människans. Det är samma receptorer och signalsystem. Tanken är då att resultaten från djurförsöken skall vara applicerbara på människan. Det är dock vedertaget att detta inte alltid stämmer, utan resultat från djurförsök har inte alltid fungerat på människor, trots den stora likheten. För att i ett senare skede försöka få fram ett terapeutiskt preparat krävs studier på djur för att studera effekter och eventuellt oväntade biverkningar. Det skulle vara av stor vikt om man kunde se en reaktiv regeneration av neuroner vid införandet av IL-1RA och NT-3 då skador på CNS är ganska vanliga. I dagsläget anses skador på CNS ej vara botbara eller reparerbara. Komplexiteten på CNS är väldigt stor och kirurgi är praktiskt taget omöjligt, så den här forskningen är betydelsefull. Att så tidigt som möjligt kunna behandla en skada och stoppa den inflammatoriska processen och kanske till och med kunna återskapa skadade neuroner skulle vara en stor framgång för forskningen. Stamcellsforskning görs också för att återskapa neuroner och där har man lyckats med någon form av nyskapande av neuroner[13]. Även en studie på ARSB (mammal enzyme arylsulfatase B) ett däggdjursenzym som förekommer i lysosomerna i levern, bukspottskörteln

och njurar har gjorts på möss, denna har påvisat att återskapandet av neuroner efter ryggmärgsskada är möjligt[14].

Genom resultaten för examensarbetet har användbara immunohistokemiska metoder testats och tagits fram som kan användas till den större studien där den inflammatoriska processen granskas närmare.]Fast forskningen har kommit en bit på vägen är det ganska långt kvar till användning på människor då inte så många in vivo försök på djur är utförda. De metoder för infärgning som användes gav goda resultat då de kan användas för den större studien. Där kommer man mer att gå in på skada med NMDA, samt behandling med IL-1RA och NT-3.

Referenser

- [1] Reilly PL, Graham DI, Adams JH, Jennett B. Patients with head injury who talk and die. *Lancet*. 1975 Aug 30;2(7931):375-7.
- [2] Zindler E, Zipp F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2010 Dec;24(4):551-62.
- [3] Hailer NP. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Progress in Neurobiology*. 2008; 84:211-233.
- [4] Yokobori S, Zhang Z, Moghieb A, Mondello S, Gajavelli S, Dietrich WD, et al. Biomarkers for spinal cord injury. *World Neurosurg*. 2013 Mar;19:1878-8750.
- [5] Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*. 2005 May;21(9):2347-60.
- [6] Dehghani F, Hischebeth GT, Wirjatijasa F, Kohl A, Korf HW, Hailer NP. The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after excitotoxic injury in hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*. 2003 Sep;18(5):1061-72.
- [7] Legacy J, Hanea S, Theoret J, Smith PD. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor promotes regeneration of retinal ganglion cells in vitro through a mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Neurosci Res*. 2013 Mar;4.
- [8] Ebrahimi F, Koch M, Pieroh P, Ghadban C, Hobusch C, Bechmann I, Dehghani F.

- Time dependent neuroprotection of mycophenolate mofetil: effects on temporal dynamics in glial proliferation, apoptosis, and scar formation. *J Neuroinflammation*. 2012 May;8:9-89.
- [9] Liu T, Jiang CY, Fujita T, Luo SW, Kumamoto E. Enhancement by interleukin-1beta of AMPA and NMDA receptor-mediated currents in adult rat spinal superficial dorsal horn neurons. *Mol Pain*. 2013 Mar 28;9(1):16.
- [10] Liu S, Xu GY, Johnson KM, Echetebe C, Ye ZS, Hulsebosch CE, et al. Regulation of interleukin-1beta by the interleukin-1 receptor antagonist in the glutamate-injured spinal cord: endogenous neuroprotection. *Brain Res*. 2008 Sep 22;1231:63-74.
- [11] Hines DJ, Haydon PG. Inhibition of a SNARE-Sensitive Pathway in Astrocytes Attenuates Damage following Stroke. *J Neurosci*. 2013 Mar 6;33(10):4234-40.
- [12] Ding S, Wang T, Cui W, Haydon PG. Photothrombosis ischemia stimulates a sustained astrocytic Ca²⁺ signaling in vivo. *Glia*. 2009 May;57(7):767-76.
- [13] Parsons XH, Parsons JF, Moore DA. Genome-Scale Mapping of MicroRNA Signatures in Human Embryonic Stem Cell Neurogenesis. *Mol Med Ther*. 2012 Dec 10;1(2).
- [14] Yoo M, Khaled M, Gibbs KM, Kim J, Kowalewski B, Dierks T, et al. Arylsulfatase B improves locomotor function after mouse spinal cord injury. *PLoS One*. 2013;8(3):e57415.