

# КОЛИЧЕСТВО И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПРОЛИФЕРИРАЩИ КЛЕТКИ В ЮВЕНИЛЕН И АДУЛТЕН ГРЪБНАЧЕН МОЗЪК НА ПРИМАТИ

Десислава Маринова<sup>1</sup>, Веселина Михалева<sup>1</sup>, Меглена Ангелова<sup>1</sup>, Стоян Павлов<sup>1</sup>,  
Тецутори Ямашима<sup>2</sup>, Ваня Горанова<sup>1</sup>, Антон Тончев<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Катедра по анатомия, хистология и ембриология,  
Медицински университет – Варна;

<sup>2</sup>Катедра по възстановителна неврохирургия, Медицински факултет,  
Университет на Каназава, Япония

## QUANTITY AND DISTRIBUTION OF PROLIFERATING CELLS IN THE JUVENILE AND ADULT PRIMATE SPINAL CORD

Dessislava Marinova<sup>1</sup>, Vesselina Mihaleva<sup>1</sup>, Meglena Angelova<sup>1</sup>, Stoyan Pavlov<sup>1</sup>,  
Tetsumori Yamashima<sup>2</sup>, Vanya Goranova<sup>1</sup>, Anton Tonchev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University, Varna;

<sup>2</sup>Department of Restorative Neurosurgery, University Graduate School of Medical Science,  
Kanazawa, Japan

### РЕЗЮМЕ

Централната нервна система (ЦНС) на възрастните (полово зрели) бозайници съдържа прогениторни клетки, които притежават способността да се диференцират в неврони и глиални клетки. Пролиферацията на такива клетки в интактния гръбначен мозък е ограничена. Докладвано е наличието им при гризачи, както и при някои примати след гръбначно-мозъчна травма, но детайлен анализ в интактен гръбначен мозък при примати липсва. Ние наскоро съобщихме за наличие на *de novo* образувани клетки в интактен гръбначен мозък при експериментални маймуни. В настоящата работа фокусирахме нашето внимание върху ювенилния и неонатален гръбначен мозък и го сравнихме с адултния такъв. За целта използвахме маркера за новообразувани клетки бромодеооксиуридин (BrdU) за изследване количеството и разпределението на позитивните клетки в гръбначно-мозъчни тъкани от маймуни на различна възраст. Според очакванията ни установихме сигнификантно увеличение на маркираните с BrdU клетки при неонаталната експериментална група. В същото време липсваше разлика между ювенилната група и тази на полово зрелите маймуни. На базата на тези резултати предполагаем, че преживяемостта на *de novo* образуваните клет-

### ABSTRACT

Multipotent progenitors exist in the adult mammalian central nervous system, capable of producing both neurons and glia. Their proliferation in the spinal cord is limited. Generation of putative stem/progenitor cells has been reported in intact and injured spinal cord of rodents and in a limited number in monkeys with a spinal injury, but not in intact spinal cord in vivo. We recently reported *de novo* generated cells in the intact spinal cord of macaque monkeys. Here we extend these findings by showing data of intact juvenile and neonatal monkey spinal cord. We used bromodeoxyuridine (BrdU) to label the *de novo* generated cells in the experimental animals and studied their quantity and distribution at different time-points after the BrdU infusion. As expected, we found a significant elevation of the BrdU-labeled cells at neonatal stage. However, there was no difference between juvenile and adult stages. These results suggest that the survival of newly born cells in the intact primate spinal cord does not change after juvenile stage and this could be used to further study repair mechanisms in adult primate spinal cord.

**Keywords:** spinal cord, primate, proliferation, BrdU

ки в интактен гръбначен мозък при примати не се променя след първата година от раждането, съвпадаща с ювенилния им период. В бъдеще това може да бъде основа за проучване на възстановителните механизми в гръбначния мозък на възрастни примати.

**Ключови думи:** гръбначен мозък, примати, пролиферация, BrdU

## УВОД

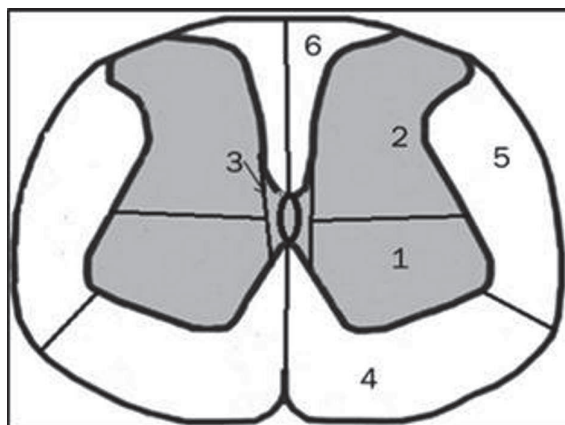
В ЦНС при израснали бозайници, включително и при човек, съществуват мултипотентни невронални стволови клетки. Те дават началото на бипотентни прогениторни клетки, които се диференцират съответно в невронална и глиална клетъчни линии, а след това всяка от тях дава зрели неврони и глия (2,4). Стволови/прогениторни клетки могат да бъдат изолирани от гръбначния мозък, култивирани и диференцирани *in vitro* (6,7). Тези клетки са по-добре проучени при гризачи, докато данните за прогениторни клетки в гръбначния мозък при примати и човек са твърде оскъдни.

Целта на настоящото проучване беше да проследим количеството, разпределението и преживяемостта на *de novo* образуваните клетки в интактен гръбначен мозък при ювенилни и възрастни примати на различни нива в сивото и бялото вещество. За представяне на пролифериращите клетки използвахме широко известния маркер BrdU, който служи за проучване на пролиферация и клетъчна генеза (8,9).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Обект на изследване бяха 10 женски японски маймуни (*Macaca fuscata*), от които 6 полово зрели в млада възраст (5-9 г.), 2 ювенилни на 1 г. и 2 новородени. Експериментите бяха осъществени в медицинския факултет на Университета в Каназава, Япония, в съответствие с правилата на комисията по етика. Животните бяха инжектирани с BrdU (100 mg/kg, i.v.) в 5 последователни дни и разпределени в следните 4 групи според преживяемостта след последната апликация на BrdU: 1) възрастни с къса преживяемост 2 часа ( $n = 3$ ); 2) възрастни с преживяемост от 5 седмици ( $n = 3$ ); 3) ювенилни на 1 година с преживяемост от 5 седмици ( $n = 2$ ) и 4) новородени с преживяемост от 5 седмици ( $n = 2$ ). Вземането, обработката на материала и имунопероксидазното оцветяване за BrdU е описано подробно в Marinova et al.,

2012 (5). Микроскопският анализ на срезите бе осъществен чрез микроскоп BX60 (Олимпус, Токио, Япония). Преброяването на BrdU+ клетки бе проведено на кодирани срези в серия от всеки 12-ти срез от шийни, гръдни и лумбални сегменти на гръбначния мозък. Всеки срез беше подразделен на 6 сектора, от които 3 в сивото и 3 в бялото вещество (Фиг. 1.). Количеството на BrdU+ клетки беше оценено като общ брой клетки на всеки срез. Получени бяха данни за всеки от секторите (Фиг. 1.), както и за среза като цяло, поотделно за шийните, гръдните и поясните сегменти.



Фиг. 1. Разделяне на гръбначния мозък на сектори - три в сивото мозъчно вещество: 1) предни рога, 2) задни рога, 3) зона около централния канал - и три сектора в бялото мозъчно вещество: 4) преден сноп, 5) страничен сноп, 6) заден сноп.

Статистическата значимост на данните за всяка експериментална група спрямо останалите 3 бе проверена с еднофакторен анализ на вариациите (one way ANOVA), последван от теста на Tukey-Kramer. Разликите бяха считани за значими при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

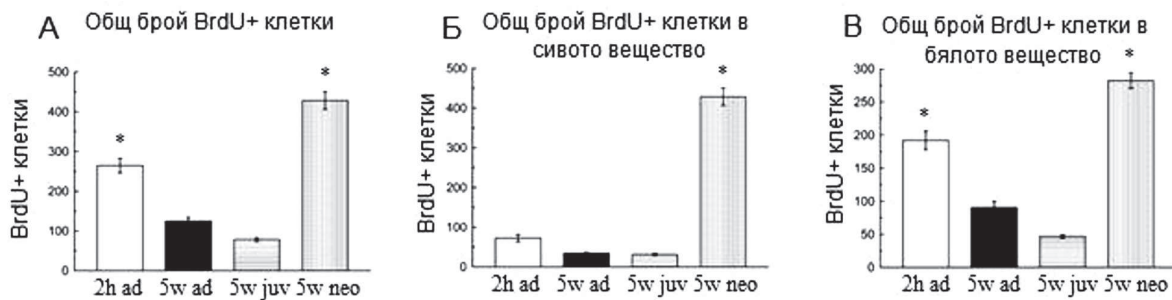
При оценка на клетъчната пролиферация на различни нива (шийни, гръдни и лумбални сегменти) на гръбначния мозък при маймуни с една и съща преживяемост след BrdU установихме сиг-

нификантно увеличение на общия брой BrdU+ клетки в шийните сегменти при новородените животни, евтаназирани на 5-та седмица след инфузията (група 4), спрямо останалите три експериментални групи. При сравнение на групата на възрастни на 2-ри час (група 2) с групата на възрастни на 5-та седмица (група 3) и ювенилни на 5-та седмица (група 3) също имаше статистически достоверна разлика, но такава не се наблюдава между група 2 и група 3 (Фиг. 2А). В сивото мозъчно вещество сигнификантно увеличение бе установено само при новородените опитни животни (Фиг. 2Б). Тенденцията за различията между групите при оценка на общия брой *de novo* образувани клетки се запазва и при бялото мозъчно вещество (Фиг. 2В).

При оценка на броя на BrdU+ клетки в бялото вещество на гръбначния мозък за всеки от секторите получихме аналогични на предходните резултати, т.е. най-висок брой *de novo* образувани клетки при неонаталните примати, следвани от възрастните животни от първа експериментална група (2 h след BrdU) (Фиг. 4). Липсваше сигнификантна разлика при отделните сектори между групата маймуни, евтаназирани на 5-та седмица, и ювенилната група, както и спрямо останалите групи.

## ДИСКУСИЯ

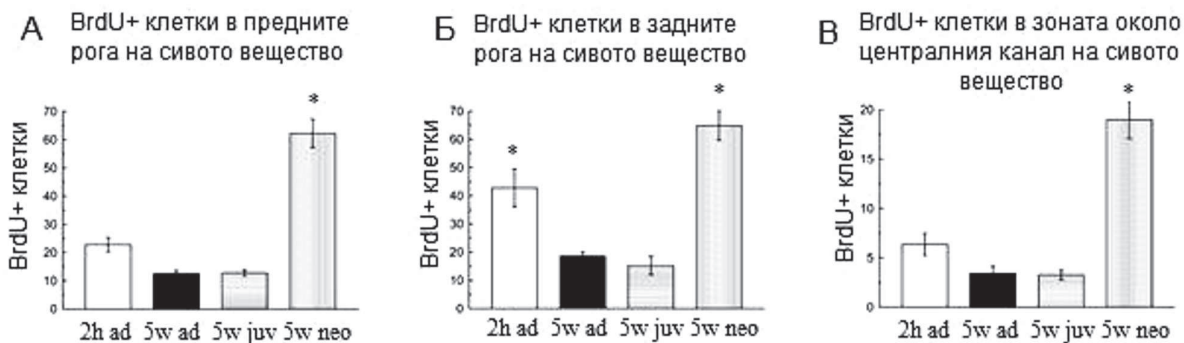
В настоящото проучване представяме данни за клетъчната пролиферация в интактен гръб-



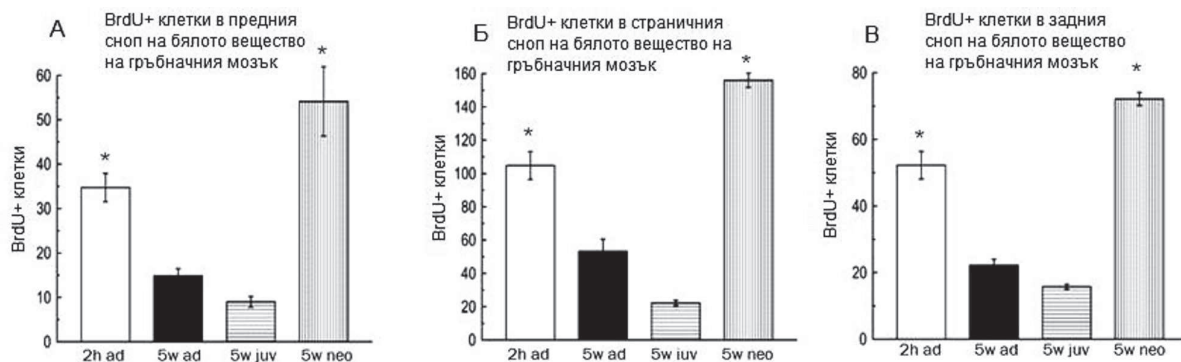
Фиг. 2. Общ брой BrdU+ клетки в цялостни срези (А), само в сивото мозъчно вещество (Б) и само в бялото мозъчно вещество (В) от шийни сегменти на 4-те групи. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите групи (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица; ad, възрастни; juv, ювенилни; neo, новородени.

При изследване на сивото вещество на гръбначния мозък по сектори: предни рога, задни рога и зона около *централния канал*, отново установихме най-голям брой BrdU+ клетки при новородените маймуни във всички изследвани сектори (Фиг. 3). От останалите групи сигнификантно повишение на броя клетки се наблюдава само в задните рога на сивото мозъчно вещество при 1-ва експериментална група (2 h след BrdU) (Фиг. 3Б).

начен мозък при новородени, ювенилни и възрастни примати в сивото и бялото вещество на различни нива. По-голямо количество BrdU+ клетки бяха регистрирани в шийните сегменти в сравнение с гръдните и поясните. В бялото вещество присъстваха повече пролифериращи клетки, отколкото в сивото, където клетките преобладаваха в задните рога. Характерното разпределение на имунопозитивните клетки по нива и сектори в интактния гръбначен мо-



Фиг. 3. Общ брой BrdU+ клетки в предните рога на сивото мозъчно вещество (А), задните рога (Б) и зоната около *canalis centralis* (В) от шийни сегменти на 4-те групи. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите групи (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица; ad, възрастни; juv, ювенилни; neo, новородени.



**Фиг. 4.** Общ брой BrdU+ клетки в предния (А), страничния (Б) и задния сноп на бялото мозъчно вещество (В) от шийни сегменти на 4-те групи. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите групи (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица; ad, възрастни; juv, ювенилни; neo, новородени.

зък при изследваните примати е показател за съществуващия по-висок индекс на пролиферация на шийно ниво и в задните рога на сивото мозъчно вещество. Преживяемостта след последната апликация на BrdU също оказва съществено значение за количеството на BrdU+ клетки. Тяхната гъстота беше най-висока при новородените маймуни, последвани от животните, евтаназирани на 2-ри час след инфузията, в сравнение с групите от възрастни и ювенилни животни на 5-та седмица след BrdU, при които не открихме статистически значими разлики. При групата на новородените водещият фактор за по-голямата гъстота на BrdU+ клетки е по-ранната възраст, която обуславя по-висок пролиферативен индекс. При възрастните животни по-малкият брой BrdU+ клетки в двете групи с дълга преживяемост в сравнение с групата с 2 часа преживяемост се дължи на многократното делене на клетките, което води до намаляване концентрацията на BrdU под нивото за имунохистохимично регистриране на маркера. Нашите резултати съответстват на данните за пролиферацията в гръбначния мозък при други бозайници (4). Считаме, че част от пролифериращите клетки са невронални стволови и прогениторни, разположени около или в епендимната зона на централния канал (1,3,6). Необходими са допълнителни изследвания за определяне на клетъчните линии на *de novo* образуваните клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cizkova D, Nagyova M, Slovinska L, Novotna I, Radonak J, Cizek M, et al. Response of ependymal progenitors to spinal cord injury or enhanced physical activity in adult rat. *Cell Mol. Neurobiol.* 2009;29(6-7):999-1013.
2. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(6):481-8.
3. Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR, Aumont A, Fernandes KJ. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience.* 2009;164(3):1044-56.
4. Horner PJ, Power A, Kempermann G, Kuhn HG, Plamer TD, Winkler J, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells through the intact adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 2000;20(6):2218-28.
5. Marinova D, Angelova M, Velikov I, Terzieva S, Goranova V, Yamashima T, Tonchev AB. Quantity and distribution of *de novo* generated cells in the spinal cord of adult macaque monkeys. *Acta. Morph. Anthr.* 2012;19(1):141-4.
6. Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 2008;6(7):e182.
7. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005; 28(1):223-50.
8. Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 1988;457(1):44-52.
9. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations and validations. *Brain.* 2007;53(1):198-214.

**Адрес за кореспонденция:**  
проф. д-р Антон Тончев  
Катедра Анатомия, хистология и ембриология,  
Медицински университет - Варна  
ул. «Марин Дринов» 55, 9002 Варна  
e-mail: anton.tonchev@mu-varna.bg