

## ФЕНОТИП НА *DE NOVO* ОБРАЗУВАНИ КЛЕТКИ В ГРЪБНАЧЕН МОЗЪК НА ВЪЗРАСТНИ МАЙМУНИ МАКАЦИ

Десислава Маринова<sup>1</sup>, Меглена Ангелова<sup>1</sup>, Веселина Михалева<sup>1</sup>, Стоян Павлов<sup>1</sup>,  
Ваня Горанова<sup>1</sup>, Тецумори Ямашима<sup>2</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

## PHENOTYPE OF *DE NOVO* GENERATED CELLS IN THE SPINAL CORD OF ADULT MACAQUE MONKEYS

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

В гръбначния мозък на полово зрели бозайници съществуват невронални стволови и прогениторни клетки. Те играят важна роля при възстановителни процеси след увреждане, но пролиферацията и диференциацията им са ограничени. В настоящото проучване ние използвахме пролиферативния маркер бромодеооксиуридин (BrdU) за един кратък (2 часа) и три продължителни периода (2, 5 и 10 седмици), за да проследим количеството, топографията и съдбата на *de novo* образувани клетки в интактен гръбначен мозък при възрастни примати (маймуни макаци). Също така приложихме по отделно или в комбинации маркери за мезенхимни и невронални стволови/прогениторни клетки за фенотипната изява на пролифериращите клетки. Установихме, че при краткия период (2 часа) броят на BrdU+ клетки е съществено повишен само в шийните сегменти. Много от клетките в епендимния слой са имунопозитивни за Виментин и/или Нестин, което е показател за тяхната клетъчна принадлежност. Значителен брой Виментин+ клетки от епендимния слой образуват характерни дълги израстъци по посока на подлежащите кръвоносни капиляри. Това показва тяхното участие като компонент на епендимната клетъчна ниша. Присъствието на BrdU+/Нестин+ клетки в зоната около централния канал определено потвърждава наличието на дялящи се не-

### ABSTRACT

Neuronal stem and progenitor cells exist in the spinal cord of sexually mature mammals. They play an important role during repairing processes after injury, but their proliferation and differentiation are limited. In the present study we used the proliferative marker bromodeoxyuridine (BrdU) for a short (2 h) and three longer survival periods (2, 5 and 10 weeks) to investigate the quantity, topography and fate of *de novo* generated cells in intact spinal cord of adult primates (macaque monkeys). We applied as well single or in combinations markers for mesenchymal cells or/and neuronal stem/progenitor cells to demonstrate the phenotype of the proliferating cells. We found that after the short period of BrdU application (2 h) the number of BrdU+ cells is significantly elevated only in the cervical segments. Most of the cells in the ependymal layer are immunopositive for Vimentin or/and Nestin. This is an indice for their cellular belonging. A considerable number of Vimentin+ cells of the ependymal layer form long characteristic processes directed to underlying blood capillaries. This indicates their participation as a component of the ependymal cellular niche. The presence of BrdU+/Nestin+ cells in the central canal surrounding zone confirms the existence of dividing neuronal stem/progenitor cells in the spinal cord of adult primates.

**Keywords:** macaque, spinal cord, progenitors, BrdU, Vimentin, Nestin

вронални стволови/прогениторни клетки в гръбначния мозък при възрастни примати.

**Ключови думи:** макаци, гръбначен мозък, прогенитори, BrdU, Виментин, Нестин

### УВОД

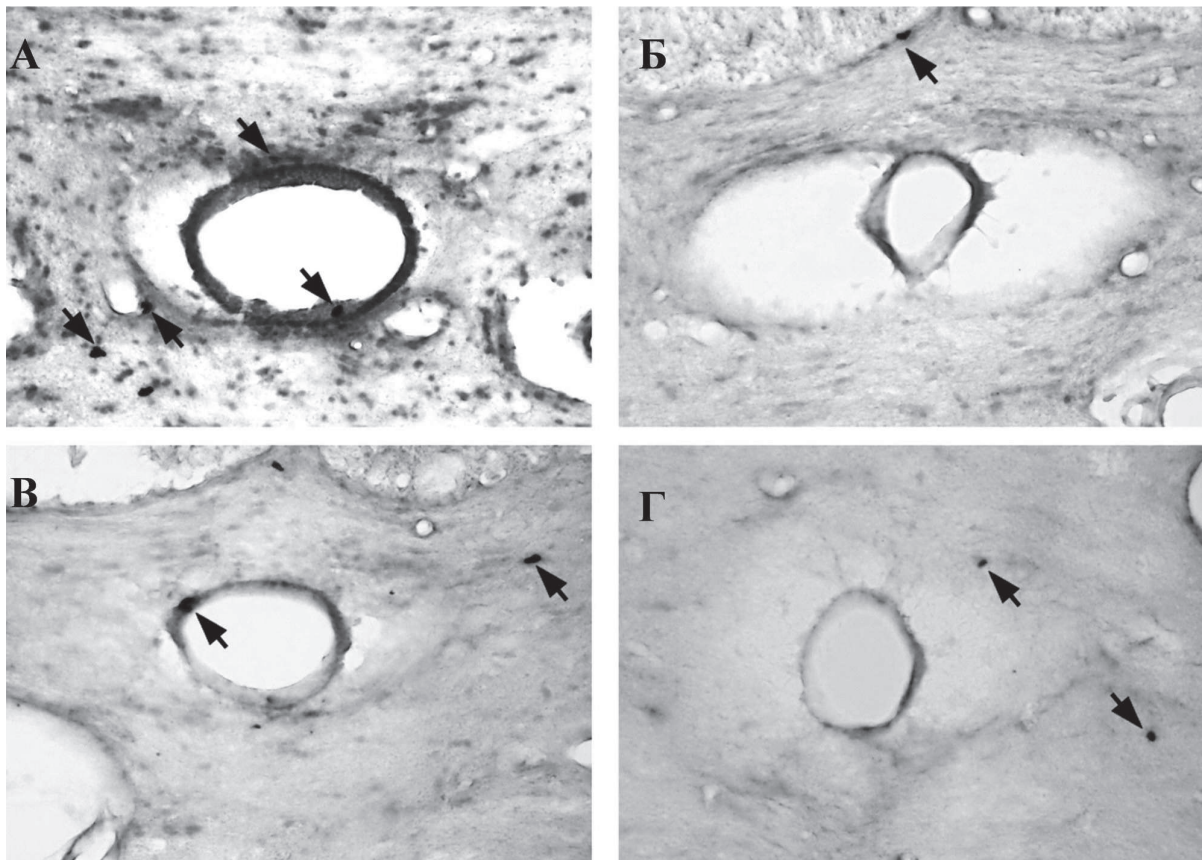
Неврогенезата е процес на образуване на нови, функционално активни неврони от стволови/прогениторни клетки. В гръбначния мозък на полово зрели бозайници съществуват невронални стволови и прогениторни клетки (1-3, 6). Терминът “мозъчни прогенитори” обозначава прекурсорни клетки, които са в състояние да се диференцират в две отделни клетъчни линии - нервни и глиални клетки. В ембрионалното развитие стволови/прогениторни клетки в мозъка експресират специфични протеини, между които Виментин и Нестин (5). Те се използват като маркери за прекурсорни клетки в централната нервна система (ЦНС) и на възрастните. Стволови клетки са изолирани от епендимната зона, заобикаляща централния канал на гръбначния мозък (4,6), тъй като там липсва субependимен

слой. Вместо астроцитите епендимните клетки от гръбначния мозък в *in vitro* условия проявяват активност на стволови клетки (8).

Засега малко е известно за епендимната клетъчна ниша в тази част на ЦНС. Ето защо ние насочихме вниманието си именно към тази зона на сивото мозъчно вещество в интактния гръбначен мозък. Целта ни беше да проучим количеството, топографията, морфологията и съдбата на новообразуваните клетки при възрастни маймуни, евтаназирани на различни периоди след инфузия с BrdU.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите бяха извършени в медицинския факултет на Университета в Каназава, Япония, след одобрение от институционалната комисия по етика. Изследванията бяха проведени



Фиг. 1. BrdU+ клетки (стрелки) в епендимния слой около централния канал и подлежащата зона при четирите експериментални групи маймуни според преживяемостта след BrdU. А – 2ч., Б – 2 седмици, В – 5 седмици, Г – 10 седмици. x20.

вурху 11 полово зрели японски маймуни (*Macaca fuscata*) на възраст 6-15 години. 5-бромо-2'-деоксиуридин (BrdU, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, САЩ) бе приложен петкратно по 1 инжекция на ден от 100 mg/kg *i.v.* Три от маймуните бяха евтаназирани 2 часа, три – на втората седмица, три – на петата седмица, и две – на десета седмица след последната BrdU инжекция. По този начин животните бяха разделени в четири групи.

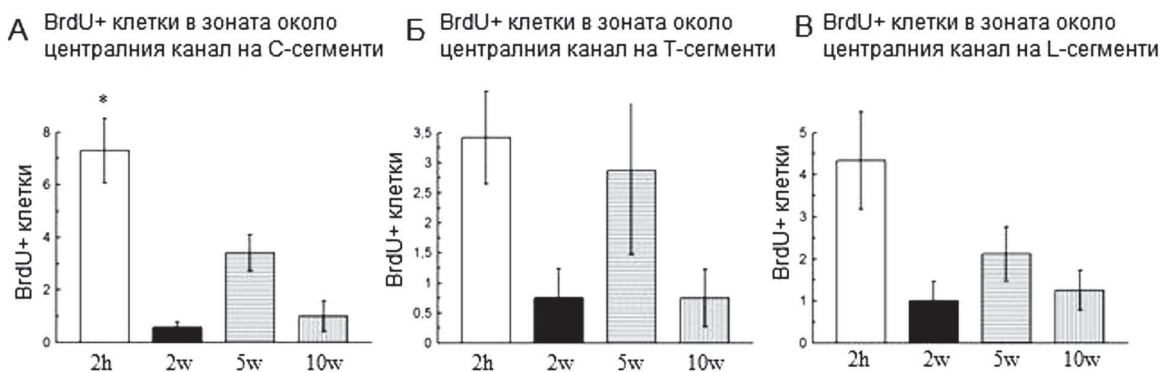
Вземането, обработката на материала и BrdU оцветяването са предварително описани в друго наше изследване (7). Оцветяванията за Виментин и Нестин бяха проведени по стандартна имунофлуоресцентна методика. Хистологичен анализ бе направен с микроскоп BX60 (Олимпус, Токио, Япония). Преброяването на BrdU+ клетки

теста на Tukey-Kramer. Разликите бяха считани за значими при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

В епендимния слой около централния канал и зоната под него се наблюдават разпръснати или в малки групички BrdU+ клетки (Фиг. 1).

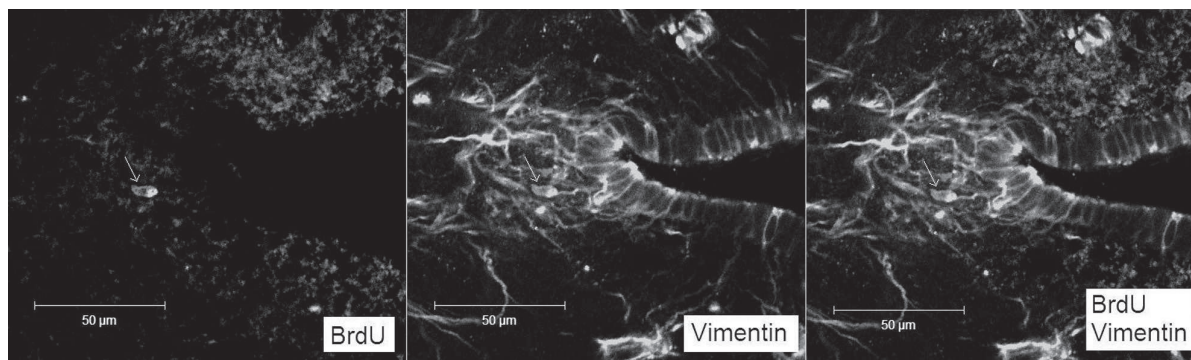
При оценка на пролиферацията на отделните нива (шийни, гръдни и лумбални сегменти) на гръбначния мозък при маймуни с различна преживяемост след BrdU, сигнификантно увеличение на броя на BrdU+ клетки се установи само в групата на 2-рия час спрямо останалите три групи, при това само на ниво шийни сегменти в сравнение с гръдните и лумбалните сегменти (Фиг. 2).



Фиг. 2. Общ брой BrdU+ клетки на срези в зоната около централния канал от шийни (А), гръдни (Б) и поясни сегменти (В) на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

в зоната на централния канал беше осъществено на кодирани срези в серия от всеки 12-ти срез от шийни, гръдни и лумбални сегменти на гръбначния мозък. Статистическата значимост на данните за всяка експериментална група спрямо останалите 3 бе отчетена с еднофакторен анализ на вариациите (one way ANOVA), последван от

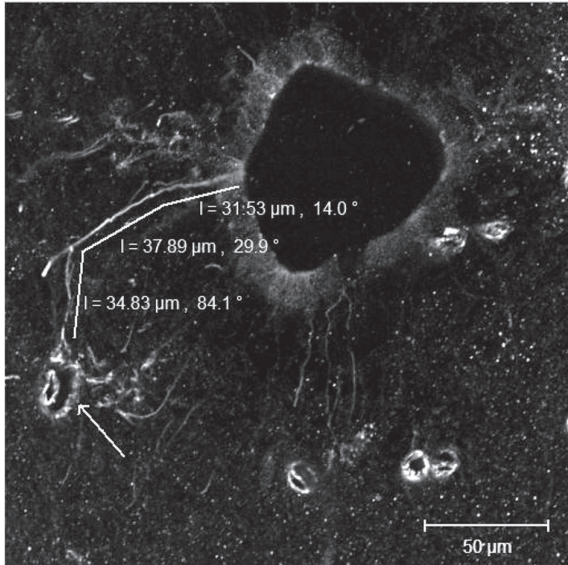
Епендимните клетки в стената на централния канал на гръбначния мозък експресират Виментин. За да установим дали тези клетки са пролифериращи, предприехме двойно оцветяване за BrdU и Виментин (Фиг. 3). Установихме, че 50% от всички BrdU+ клетки в епендимния слой и в зоната около централния канал както в кратко-



Фиг. 3. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване за BrdU/Виментин в зоната около централния канал на срез от шийен сегмент на маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена BrdU+/Виментин+ клетка.

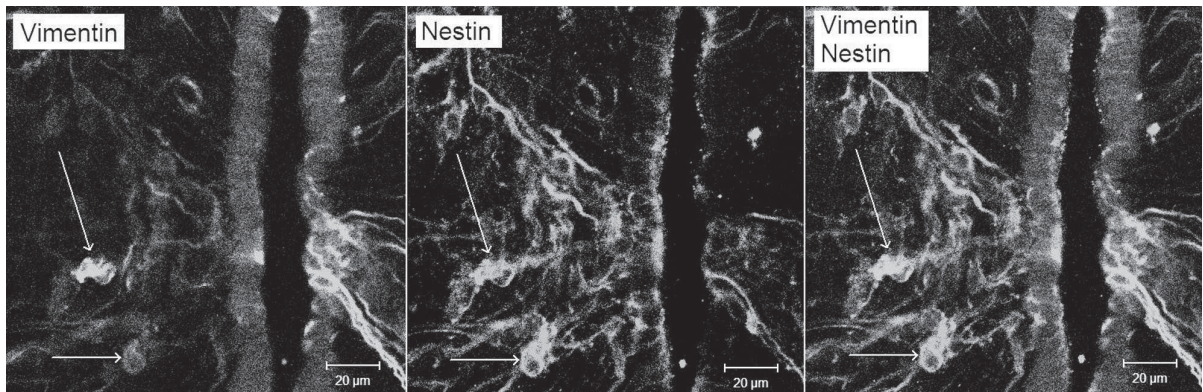
срочната, така и в дългосрочната експериментална група са Виментин+.

Виментин+ клетки образуват дълги израстъци по посока на кръвоносните съдове в съседство, като някои от тези израстъци достигат доста големи размери (Фиг. 4).



Фиг. 4. Имунофлуоресцентно оцветяване за Виментин в зоната около централния канал на срез от шиен сегмент на маймуна, евтаназирана на 10-та седмица след инфузия с BrdU. Представена е дължината на израстък на Виментин+ клетка от епендимния слой на централния канал (обща дължина  $\approx 102 \mu\text{m}$ ), насочен по посока на кръвоносен съд (стрелка).

Установихме, че част от клетките на епендимния слой, както и зоната около централния канал, в дългосрочната група са позитивни както за Виментин, така и за Нестин (Фиг. 5). Част от Виментин+ клетки притежават дълги израстъци, които образуват мрежа, насочена назад от задния полюс на централния канал.



Фиг. 5. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване за Виментин/Нестин в зоната централния канал на срез от шиен сегмент на маймуна, евтаназирана на 2-рия час след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена Виментин+/Нестин+ клетка.

По-голяма плътност на Виментин+/Нестин+ клетки установихме в задния полюс на централния канал. Същата тенденция, но по-слабо изразена, наблюдавахме и в предния полюс на описаната зона.

## ДИСКУСИЯ

При направеното от нас изследване върху интактен гръбначен мозък при възрастни примати използвахме тимидиновия маркер BrdU за представяне на пролифериращите клетки. Той се инкорпорира в ДНК по време на синтетичната фаза на клетъчния цикъл и служи за проучване на делещите се клетки по време на невrogenезата (9, 10). Установихме по-голям брой пролифериращи клетки в шийния отдел в сравнение с гръдния и поясния. Преживяемостта след последната апликация на BrdU оказва съществено значение за количеството на BrdU+ клетки. По-малкият брой BrdU+ клетки в групите с дълга преживяемост (2, 5 и 10 седмици) в сравнение с групата с къса преживяемост (2 часа) се дължи на многократното делене на клетките и съответно редуциране на пролиферативния маркер под необходимото ниво за регистриране. Получените резултати съответстват на данните за пролиферацията в гръбначния мозък при други бозайници (3). Считаме, че част от *de novo* образуваните клетки са невронални стволови и прогениторни, разположени около или в епендимната зона на централния канал (3, 5). Характерното им разпределение по нива и сектори в интактния гръбначен мозък при изследваните примати е показател за съществуващия по-висок индекс на пролиферация на шийно ниво и в задните рога на силовото вещество.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8.
2. 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.
3. 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.
4. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999;96(1):25-34.
5. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-95.
6. Martens DJ, Seaberg RM, van der Kooy D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci*. 2002;16(6):1045-57.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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