

КЛЕТЪЧНА ПРОЛИФЕРАЦИЯ В КОРАТА НА ПОСТИСХЕМИЧЕН МАЛЪК МОЗЪК ПРИ ПРИМАТИ

Веселина Михалева¹, Ваня Горанова¹, Меглена Ангелова¹, Стоян Павлов¹,
Тецутори Ямашима², Антон Тончев¹

¹Катедра по анатомия, хистология и ембриология,
Медицински университет – Варна

²Катедра по възстановителна неврохирургия, Медицински факултет,
Университет на Каназава, Япония

CELLULAR PROLIFERATION IN THE CORTEX OF POSTISCHEMIC CEREBELLUM BY PRIMATES

Vesselina Mihaleva¹, Vanya Goranova¹, Meglena Angelova¹, Stoyan Pavlov¹,
Tetsumori Yamashima², Anton Tonchev¹

¹Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University of Varna

²Department of Restorative Neurosurgery, Medical Faculty, University of Kanazawa, Japan

РЕЗЮМЕ

Клетъчно-тъканните механизми на увреждане и възстановяване след мозъчна исхемия имат фундаментално приложно значение. Целта на настоящото проучване беше да установим промени в клетъчната пролиферация чрез бромдеоксиуридин (BrdU), индикатор за ДНК синтеза, при новородени, едногодишни и половозрели в млада възраст японски маймуни (*Macaca fuscata*) след глобална мозъчна исхемия на малкия мозък. Според възрастта, схемата на приложение на BrdU (2 дена x 250 mg/kg или 5 дена x 100 mg/kg i.v.) и срока на преживяемост след исхемията (съответно 4, 9 и 15 дни) животните бяха разпределени в няколко контролни и експериментални групи. Приложихме имунохистохимично оцветяване с пероксидаза на замразени срези от малкия мозък на изследваните животни за изтъкване на пролиферативния маркер BrdU. При сравнение на количеството BrdU+ клетки в малкомозъчната кора между групите на новородени, едногодишни и възрастни животни без исхемия се установи, че с увеличаване на възрастта пролиферативните процеси значително намаляват до относително слабо изразено поддържащо ниво. При сравнение между групите на възрастните животни с различна продължителност на исхемия се оказа, че тя е важен фактор, стимулиращ клетъчната пролиферация, като този ефект намалява с времето след исхемията. Предстои фенотипизиране на BrdU+ клетки, за

ABSTRACT

Tissue and cellular mechanisms of damage and restoration after brain ischemia have fundamental as well as practical significance. The goal of the present study was to determine changes in cellular proliferation by bromodeoxyuridin (BrdU), indicator of DNA synthesis, in the cerebellum of newborn, one year old and adult Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) after global brain ischemia. According to the age, BrdU paradigm (2 days x 250 mg/kg i.v. or 5 days x 100 mg/kg) and survival period after ischemia (4, 9 and 15 days correspondingly) the animals were distributed in several control and experimental groups. We applied immunohistochemical staining with peroxidase on frozen sections from cerebella of the monkeys examined to demonstrate the proliferative marker BrdU. Comparison of the amount of BrdU+ cells in cerebellar cortex between non-ischemic control groups of different age showed a significant age dependent decline in the proliferative processes achieving a relatively low supporting level. Comparison between groups of adult monkeys, subjected to ischemia with different duration, indicated that it is an important factor which induced cellular proliferation in the cerebellum but this effect declined with the time after ischemia. A forthcoming phenotyping of BrdU+ cells will differentiate between types of newborn cells and their relationship in the postischemic cerebellar cortex. The data acquired may expand and enlarge the understanding about restorative processes after ischemic injury to the cerebellum in the primates examined.

да се определят видовете новообразувани клетки и тяхното съотношение в кората на малкия мозък след исхемията. Получените данни ще допълнят и разширят разбирането за възстановителните процеси след исхемично увреждане на малкия мозък при изследваните примати.

Ключови думи: исхемия, пролиферация, BrdU, малкомозъчна кора, примати

УВОД

В мозъка при възрастни бозайници са открити мултипотентни неврални стволови клетки, които могат да пролиферират в бипотентни прогениторни клетки на две отделни клетъчни линии – невронална и глиална, и да образуват зрели неврони и глия (4,5,8). Тези клетки осъществяват физиологична регенерация и участват при възстановяването след увреждания на нервната система (3,9). Исхемията е най-честата причина за нарушение на мозъка със сериозни здравни и социални последици. Това обуславя големия интерес към механизмите, контролиращи невроналната клетъчна смърт и последващата регенерация. Съществуват множество животински модели, които изследват *in vivo* постисхемичните явления. Нашата работна постановка включва модел на глобална мозъчна исхемия при примати, за да изследваме количеството и фенотипа на *de novo* генерираните клетки в постисхемичен малък мозък на половозрели примати. За представяне и проследяване на пролифериращите клетки използвахме широко известния тимидинов аналог BrdU, който служи за проучване на неврогенезата (7,12), включително и при малкия мозък (10).

Целта на настоящото проучване беше да установим промени в клетъчната пролиферация на малкомозъчната кора на различна възраст и след глобална мозъчна исхемия с различна продължителност при възрастни японски примати. Това би допринесло за по-задълбочено разбиране относно механизмите на пролиферация, миграция и диференциация на невралните стволови / прогениторни клетки в малкия мозък и би помогнало за намирането на нови терапевтични подходи при исхемични мозъчни нарушения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

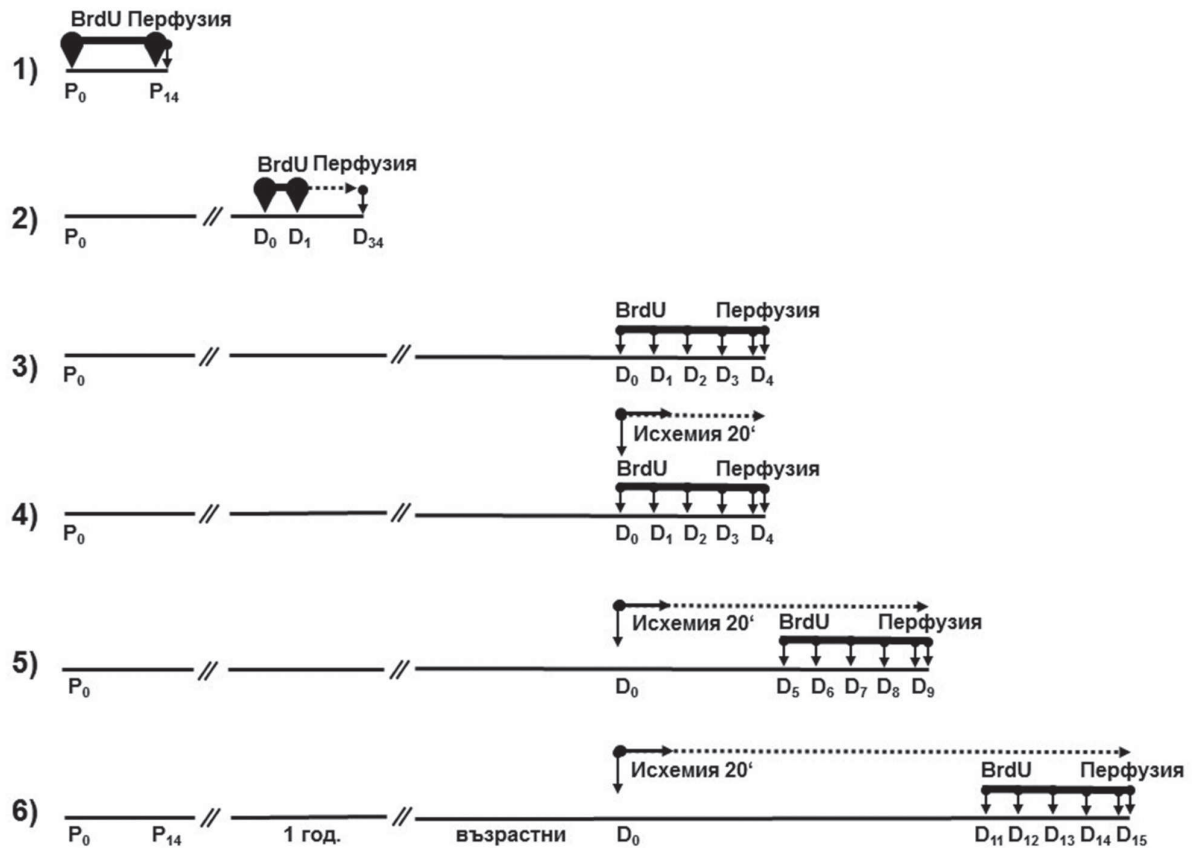
Експериментите бяха осъществени в медицинския факултет на Университета в Каназава, Япония, според правилата на местната коми-

Keywords: ischemia, proliferation, BrdU, cerebellar cortex, primates

сия по етика. Обект на изследване бяха 12 женски японски маймуни (*Macaca fuscata*), от които 2 новородени, 2 ювенилни на 1 г. и 8 половозрели в по-млада възраст (5-9 г.). Животните бяха разпределени в общо 6 групи, във всяка по 2 животни, в зависимост от схемата на приложение на BrdU и срока на исхемията (виж Фиг. 1). Хирургическата процедура на глобалната мозъчна исхемия е представена в Tonchev et al. (13). Под пълна упойка маймуните бяха перфузирани интракардиално с 4% параформалдехид в 0.1 М фосфатен буфер, рН7.4. Мозъците бяха извадени, нарязани на подходящи парчета и постфиксирани за 2-3 часа. След криопротекция и замразяване бяха нарязани парасагитални срези от малкия мозък с дебелина 40 μm и съхранявани при -20°C . Приложен беше стандартен имунохистохимичен метод с пероксидаза за изтъкване на BrdU. ДНК беше денатурирана в разтвор на 50% формамид/2x SSC на 65°C за 2 часа и последващ престой в 2N HCl на 37°C за 30 мин. Използвани бяха първо анти-BrdU антитяло от мишка или от плъх (1:100), а след него беше приложено съответното второ антитяло, маркирано с биотин чрез комплекса авидин/пероксидаза (ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, САЩ). Реакцията бе визуализирана с разтвор, съдържащ 0.25 mg/mL диаминобензидин (Sigma) и 0.03% H_2O_2 за 30-60 секунди. Микроскопският анализ на срезите бе осъществен с помощта на микроскоп VX60 (Олимпус, Токио, Япония).

РЕЗУЛТАТИ

Изследвахме различни парадигми на приложение на BrdU, за да сравним динамиката и степента на инкорпориране на маркера според възрастта и времето след исхемията (Фиг. 1). Установихме, че при новородените и едногодишните животни количеството на BrdU+ клетки е значително по-високо в сравнение с тези при възрастните контроли (Фиг. 2). При новородените животни все още се наблюдава добре изразен външен зърнест слой, който



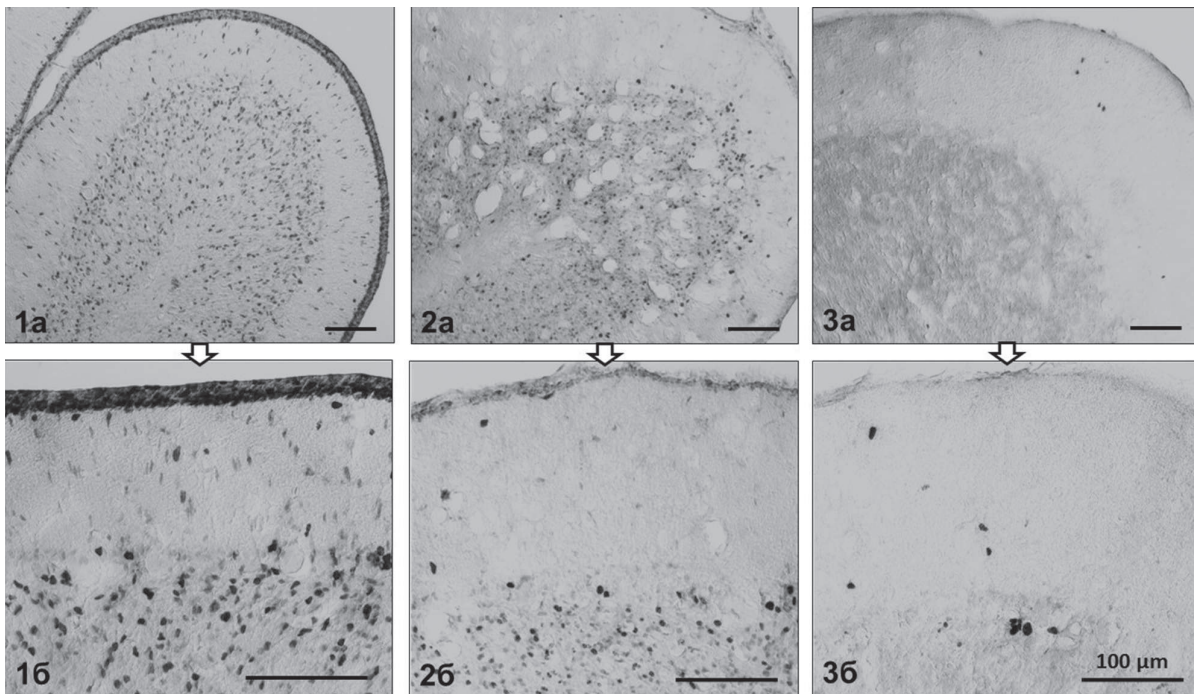
Фиг. 1. Различни парадигми на приложение на BrdU и глобална мозъчна исхемия: 1) група - новородени животни x 250 mg/kg BrdU i.p. ежедневно на P0 и P14; 2) група - на възраст от 1 година x 250 mg/kg BrdU i.p. ежедневно на D0 - D1; 3), 4), 5) и 6) група - възрастни животни x 100 mg/kg BrdU i.p. ежедневно при групи 3) и 4) на D0 - D4, при група 5) на D5 -D9 и при група 6) на D11 - D15. При групи 1), 2) и 3) няма исхемия, а при групи 4), 5) и 6) има исхемия за 20 мин. на ден D0. Перфузия на животните е осъществена 2 ч. след последната инжекция на BrdU при групи 1), 3), 4), 5) и 6) или на 34 ден при група 2). P, постнатален ден; D, ден на приложение на BrdU и/или исхемията

съдържа значително количество маркирани с BrdU клетки. Молекулярният и вътрешният зърнест слой в тази група също показват голяма концентрация на пролифериращи клетки, която е по-силно изразена в сравнение с едногодишните животни. При възрастните се установяват само единични BrdU+ клетки, наредко разположени в молекулярния и зърнестия слой.

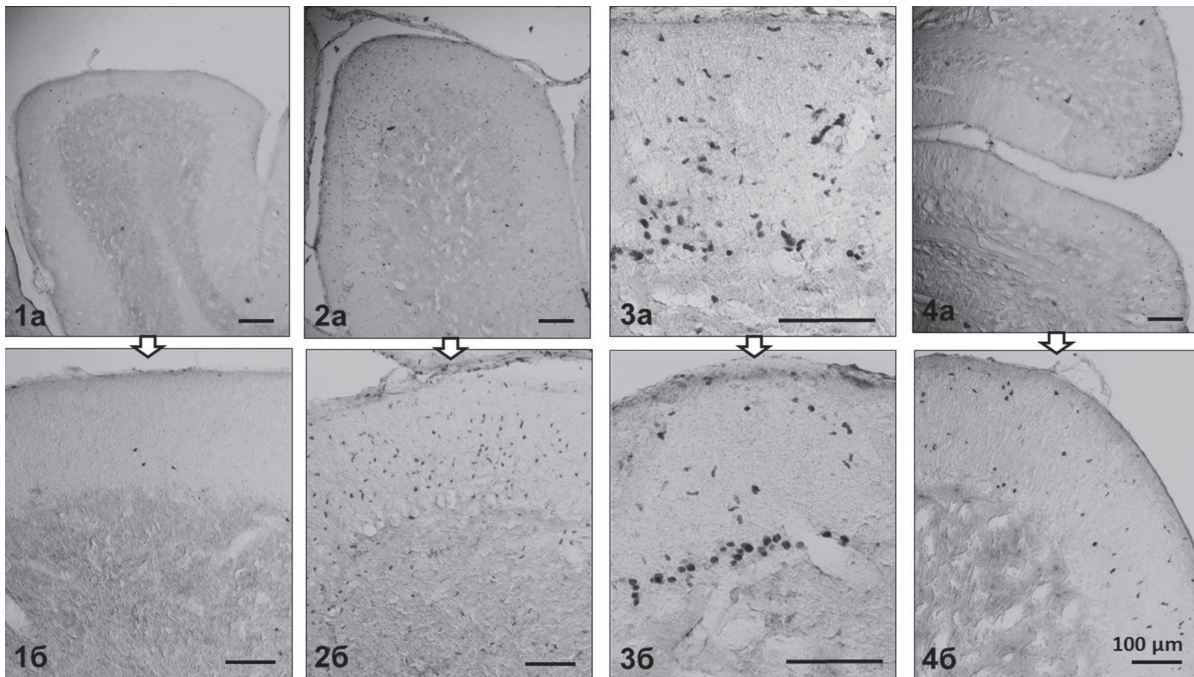
При сравнение на контролната група 3) на възрастните животни с отделните групи, подложени на исхемия, т.е. групи 4), 5) и 6) според Фиг. 1, установихме значително повишение на BrdU+ клетки при групите с исхемия (Фиг. 3). При сравнение само между тях се оказа, че краткосрочната група, т.е. D0 - D4 или 4), показва най-много BrdU+ клетки в сравнение с другите две групи 5) и 6) (Фиг. 3). Новообразуваните клетки бяха почти равномерно разпределени в молекулярния и зърнестия слой.

ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване представяме данни за клетъчната пролиферация в кората на малкия мозък при новородени, ювенилни и възрастни примати във възрастов аспект и след исхемия. Инкорпорирането на тимидиновия аналог BrdU в отделните възрастови групи логично беше по-силно изразено при по-младите животни. При новородените количеството на BrdU+ клетки превишаваше значително тези при едногодишните, а от своя страна при тях също имаше значително повече пролифериращи клетки, отколкото при възрастните контроли. Преживяемостта след последната апликация на BrdU също оказва съществено значение за количеството на BrdU+ клетки. При възрастните животни по-малкият брой BrdU+ клетки в двете групи с по-дълга преживяемост (9 и 15 дни) в сравнение с групата с по-къса преживяемост (4 дена) се дължи на многократното делене на клетките, което



Фиг. 2. Количество на BrdU+ клетки в малкомозъчната кора при новородени (1 а,б), едногодишни (2 а,б) и възрастни животни (3 а,б) в отсъствие на исхемия. Приложената парадигма за BrdU е съответно 1), 2) и 3) според Фиг. 1. Имунохистохимично оцветяване за BrdU с DAB субстрат



Фиг. 3. Количество на BrdU+ клетки в малкомозъчната кора след ежедневно приложение на 100 mg/kg i.p. за 5 дни при контролни възрастни животни без исхемия на D0 - D4 (1 а,б) и в състояние на исхемия с различна преживяемост на D0 - D4 (2 а,б), D5 -D9 (3 а,б) и D11 - D15 (4 а,б). Приложената парадигма за BrdU е съответно 3), 4), 5) и 6) според Фиг. 1. Имунохистохимично оцветяване за BrdU с DAB субстрат

води до намаляване концентрацията на BrdU в много от пролифериращите клетки под необходимото ниво за имунохистохимично регистриране на маркера. При новородените живот-

ни наблюдавахме добре изразен външен зърнест слой, където установихме интензивна пролиферация. Считаме, че голяма част от пролифериращите клетки са невронални стволови и прогени-

торни клетки, които напускат този слой. Нашите начални резултати съответстват на данните на други изследователи, според които новообразуваните клетки от този слой са основно млади постмитотични неврони, мигриращи във вътрешния зърнест слой (1,6). С увеличаване на възрастта клетъчната пролиферация в кората на малкия мозък при приматите намалява, както е установено и при мишки (2,11). Също така външният зърнест слой постепенно изчезва, а остава само дефинитивният зърнест слой на мястото на вътрешния зърнест слой.

Исхемията при възрастните животни се оказва важен фактор, който стимулира клетъчната пролиферация в малкия мозък. Установеният по-голям брой BrdU+ клетки при всички групи с исхемия по отношение на съответните контроли показва стимулиращото влияние на исхемията по отношение на клетъчното делене. Този ефект обаче се редуцира с нарастването на преживяемостта след исхемията. Необходими са допълнителни изследвания с двойно или тройно паралелно оцветяване за други маркери, показващи етапите на диференциация на различните клетъчните линии на *de novo* образуваните клетки.

ИЗВОДИ

При физиологични условия през първата година на постнаталната онтогенеза при изследваните примати пролиферативните процеси в малкия мозък намаляват с увеличаване на възрастта. Исхемията при възрастните животни се оказва важен фактор, който стимулира клетъчната пролиферация в малкия мозък, но този ефект намалява с времето след исхемичното увреждане.

ЛИТЕРАТУРА

1. Butts T, Green MJ, Wingate RJ. Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. *Development*. 2014;141(21):4031-41.
2. Espinosa JS, Luo L. Timing neurogenesis and differentiation: insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 2008;28(10):2301-12.
3. Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*. 2013;80(3):588-601.
4. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(6):481-8.

5. Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci*. 2005 8(6):723-9.
6. Martinez S, Andreu A, Mecklenburg N, Echevarria D. Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat*. 2013;7:1-18.
7. 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.
8. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:223-50.
9. Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist*. 2003;9(4):261-72.
10. Seto Y, Ishiwata S, Hoshino M. Characterization of Olig2 expression during cerebellar development. *Gene Expr Patterns*. 2014;15(1):1-7.
11. Su X, Guan W, Yu YC, Fu Y. Cerebellar stem cells do not produce neurons and astrocytes in adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(1):378-83.
12. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations and validations. *Brain*. 2007;53(1):198-214.
13. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci*. 2003;23(2):292-301.

Адрес за кореспонденция:

Ваня Горанова Стефовска
Катедра по анатомия, хистология и ембриология,
Медицински университет – Варна
ул. Марин Дринов 55
9002, Варна, България
e-mail: vanya.goranova@tu-varna.bg