

Медицински университет “Проф. Параскев Стоянов” - гр. Варна  
Факултет по Медицина  
Катедра по анатомия, хистология и ембриология

**д-р Десислава Маринова Маринова**

**Пролиферация и диференциация на  
прогениторни клетки в гръбначен мозък на  
възрастни примати**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна  
степен “Доктор”

Научна специалност: „Анатомия, хистология и цитология“  
Шифър: 03.01.02

Научни ръководители: проф. д-р Антон Б. Тончев, дмн  
доц. д-р Ваня Г. Стефовска, дм

Научен консултант: проф. д-р Тецумори Ямашима, дм

Официални рецензенти: проф. д-р Стефан Т. Сивков, д.м.  
проф. д-р Николай Е. Лазаров, д.м.н.

Варна, 2014

Дисертационният труд съдържа 130 страници, онагледен е със 77 фигури и 6 таблици. Литературната справка съдържа 188 заглавия, от които 2 са на кирилица, а останалите - на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от катедрен съвет на катедрата по Анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – Варна. Тъканите са дарени от проф. д-р Тецумори Ямацима, дм, ръководител на катедра по Регенеративна неврохирургия при университета в Каназава, Япония. Имунохистохимичните изследвания са извършени в катедрата по Анатомия, хистология и ембриология, Медицински университет – Варна и катедра по физиология на растенията и молекулярна биология към Биологичния факултет на Пловдивския университет.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 26. 09. 2014 г. от 16. 00 часа в III - та аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна на открито заседание на научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение в библиотеката на МУ- гр. Варна.

## Съдържание

<b>1. Използвани съкращения</b> .....	4
<b>2. Увод</b> .....	5
<b>3. Цел и задачи</b> .....	6
<b>4. Материали и методи</b> .....	7
4.1. Експериментални животни .....	7
4.2. BrdU протокол .....	7
4.3. Обработка на тъканите .....	7
4.4. Пероксидазна имунохистохимия .....	8
4.5. Флуоресцентна имунохистохимия .....	9
4.6. Анализ на препаратите .....	9
4.7. Статистическа обработка .....	10
<b>5. Резултати</b> .....	11
5.1. Количествен анализ на броя на de novo образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с различна преживяемост след апликацията на BrdU .....	11
5.2. Количествен анализ на броя на de novo образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с един и същи срок на преживяемост след BrdU .....	13
5.3. Гъстота на de novo образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с различна преживяемост след апликацията на BrdU .....	16
5.4. Сравнение на броя на de novo образувани клетки в сивото и бялото мозъчно вещество на шийни, гръдни и лумбални сегменти на гръбначен мозък на възрастни маймуни, евтаназирани на различни интервали след апликацията на BrdU .....	21
5.5. Сравнение на броя на de novo образувани клетки в различните зони на интерес в шийни сегменти на гръбначен мозък при възрастни маймуни, евтаназирани на 2-ри час и 5-та седмица, след апликацията на BrdU, ювенилни и новородени животни, жертвани на 5-та седмица след BrdU .....	22
5.6. Доказване селективността на BrdU като пролиферативен маркер .....	24
5.7. Имунохистохимично изследване на пролиферацията на микроглия, глиални прогенитори и глиални клетки в сивото и бялото вещество на гръбначен мозък .....	24
5.8. Имунохистохимично изследване на транскрипционните фактори в сивото и бялото вещество на гръбначен мозък .....	27

5.9. Имунохистохимично изследване на зоната на централния канал на гръбначен мозък .....	30
<b>6. Обсъждане</b> .....	<b>33</b>
6.1. Съсредоточаване на пролиферативните процеси в задните рога на сивото мозъчно вещество и задния сноп на бялото мозъчно вещество в гръбначния мозък на примати .....	33
6.2. Имунохистохимично сравнение на пролиферативните процеси в сивото и бялото вещество между гризачи и примати .....	34
6.3. Обобщаващо сравнение на експресията на транскрипционни фактори в гръбначен мозък на гризачи и примати .....	36
6.4. Имунохистохимично сравнение на пролиферативните процеси в зоната на централния канал на сивото мозъчно вещество в гръбначен мозък на гризачи и примати .....	38
<b>7. Изводи</b> .....	<b>40</b>
<b>8. Приноси на дисертационния труд</b> .....	<b>40</b>
<b>9. Публикации във връзка с дисертационния труд</b> .....	<b>41</b>
<b>10. Участия в научни форуми</b> .....	<b>41</b>

## 1. Използвани съкращения

**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина  
**ЦНС** – централна нервна система  
**BrdU** – 5-bromo- 2'-deoxiuridin  
**C** – cervical  
**DAB** – диаминобензидин  
**GFAP** – glial fibrillary acidic protein  
**Iba1** – ionized calcium binding adaptor molecule  
**i.v.** – интравенозно  
**L** – lumbar  
**NeuN** – neuron-specific nuclear protein  
**PBS** – phosphate buffered saline  
**SHH** – sonic hedgehog  
**SSC**– standard sodium citrate  
**TBS** – T- Тритон X-100 (Tris Buffered Saline)  
**TGF –  $\beta$**  – transforming growth factor beta  
**T** – thoracic  
**vWF** – von Willebrand factor

## 2. Увод

Неврогенезата е процес на образуване на нови функционално активни неврони от стволови/прогениторни клетки. Този процес протича най-активно по време на ембрионалното развитие, докато в постнаталния период е силно редуциран.

За първи път неврогенеза е описана от Altman през 1962 година, но по това време огромното мнозинство от изследователи в областта на невронауките не и отдават нужното внимание. Днес, половин век по-късно, това е една от най-бързо развиващите се области на невронауката. Усилията на много учени и надеждите на голям брой пациенти са насочени към различните възможности за манипулиране на невроналните стволови клетки и тяхното приложение в лечението на първични заболявания и травми на централната нервна система.

Мозъкът на възрастните (достигнали полова зрялост) бозайници съдържа стволови и прекурсорни клетки, разположени в така наречените „прогениторни ниши“. Днес е общоприето съществуването на две такива зони: субвентрикуларната зона на латералния вентрикул и субгрануларната зона на хипокампа. Пролиферацията, миграцията и диференциацията на прогениторни клетки в централната нервна система на възрастни примати е слабо проучена. Откриването и проследяването на тези клетки изисква използването на методи, чиято употреба при хора е ограничена поради етични причини. Ето защо експерименталните модели, в които опитни животни са маймуните са изключително полезни за невронауката.

Настоящото изследване е насочено към количествен анализ, а в последствие и фенотипизиране, и проследяване на дългосрочната съдба на стволови/прогениторни клетки в интактен гръбначен мозък на възрастни примати. Ние доказваме наличието на *de novo* образувани клетки в бялото и сиво вещество на гръбначния мозък както, и тяхното преживяване в продължение на поне 10 седмици след маркирането. Извършили сме и анализ на разпределението на маркирани новообразувани клетки по гръбначномозъчни сегменти при възрастни японски макаки.

Задълбочен анализ на представения проблем би имал отношение към бъдеща заместителна клетъчна терапия при вродени и придобити заболявания на гръбначния мозък при хора. Данните за ендогенни прогениторни клетки и тяхната съдба в гръбначен мозък на възрастни примати ще разширят възможностите за терапевтичното им приложение в борбата със заболявания на централната нервна система, протичащи с невронална или глиална клетъчна смърт.

### 3. Цел и задачи

#### 3.1. Цел

Изследване на количеството и фенотипа на *de novo* генерирани клетки в интактен гръбначен мозък на половозрели маймуни.

#### 3.2. Задачи

- ✓ Инжектиране на бромдеоксиуридин (BrdU) на маймуни и изследване на тъкани от интактен гръбначен мозък на различни интервали след това.
- ✓ Определяне количеството на BrdU-позитивните клетки в гръбначния мозък по сегменти (шийни, гръдни, поясни).
- ✓ Определяне разпределението на BrdU-позитивните клетки в гръбначния мозък (сиво вещество, бяло вещество, зона около *canalis centralis*).
- ✓ Определяне на фенотипа на BrdU-позитивните клетки в гръбначния мозък по сегменти (шийни, гръдни, поясни).
- ✓ Установяване експресия на транскрипционни фактори в пролифериращи клетки в гръбначния мозък на маймуни.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Експериментални животни

Експериментите с маймуни бяха извършени в Университета на Каназава, Япония, като тъкани от гръбначен мозък бяха предоставени от проф. Тецумори Ямашима, дм, ръководител на катедрата по регенеративна неврохирургия в същия университет. Експерименталните процедури бяха извършвани след одобрение и в съответствие с правила на Комисията по Етика на Института за експериментални животни на Медицинския факултет на Университета на Каназава, гр. Каназава, Япония. Обект на изследване бяха тъкани от половозрели японски маймуни (*Macaca fuscata*) в млада възраст (5-9 год.), n=11. Освен това включихме, с цел сравнение на пролиферативните процеси, 2 ювенилни и 2 новородени екземпляра.

### 4.2. BrdU протокол

5-бромо-2'-деоксиуридин (BrdU, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, САЩ) бе разтворен в стерилен физиологичен разтвор (0.9 NaCl), съдържащ 0.007N NaOH. Всички маймуни са инжектирани петкратно (1 инжекция на ден) със 100 mg/kg i.v. от горепосочения разтвор. Три от възрастните маймуни са евтаназирани 2 часа след последната BrdU инжекция, три – на втората седмица, три – на пета седмица и две – на десета седмица след последната апликация. За статистическата обработка на резултатите възрастните примати бяха разделени в 4 експериментални групи (в зависимост от времето след BrdU), а за целите на имунихистохимията - в две експериментални групи: с кратка преживяемост (2 h след BrdU) и с дълга преживяемост (2, 5 и 10 седмици след BrdU). Младите и новородените маймуни са жертвани на 5-та седмица след апликацията на тимидиновия аналог и формират 2 допълнителни експериментални групи.

### 4.3. Обработка на тъканите

Маймуните са евтаназирани чрез ексангвинация, осъществена под обща анестезия. Гръбначния канал бе отворен и целият гръбначен мозък бе отделен и постфиксиран в 4% параформалдехид за още 2-3 часа. След това мозъците бяха нарязани на напречни резени с дебелина около 5 mm и последните бяха прехвърлени в разтвор на 30% захароза в PBS (съдържащ 0.1% натриев азид за консервация) с цел криопротекция. След завършване на инфилтрацията на тъканите със захароза (демонстрирано с потъването на последните на дъното на съда), тъканни блокчета с размери припл. 2 x 2 cm бяха поставени в среда за криосрези (Optimal Cutting Temperature, OCT medium, Tissue-Tek, Sakura Finetech Co, Токуо, Япония) за през нощта и замразени на -70°C. Замразените блокчета

бяха нарязани на криомикротом. Дебелината на срезите бе 40  $\mu\text{m}$ . Всеки срез бе последователно подреждан в кладенчетата на съд за клетъчни култури (multi-well plate), съдържащи фосфатен буфер. Тъй като срезите от 1 блокче бяха преразпределяни върху 12 кладенчета, всяко кладенче съдържащо серия от всеки 12-ти срез от даденото блокче. В последствие фосфатният буфер бе заменен с криопротективен буфер, съдържащ 25% глицерол и 25% етилен гликол (Wako, Токуо, Япония) във фосфатен буфер и срезите бяха съхранявани при температура -20°C до началото на оцветяването им.

#### **4.4. Пероксидазна имунохистохимия**

Оцветяването за BrdU бе осъществено по индиректния пероксидазен метод, следвайки тристъпна процедура. По време на всички стъпки на оцветяването, срезите плуваха свободно в кладенчетата на горепосочените съдове за клетъчни култури. Съответните срези биваха прехвърляни от криопротективния буфер в буфер, съдържащ TBS (tris buffered saline, pH 7.4) с разтворен в него Triton X-100 (TBS-T). Ендогенната пероксидаза бе блокирана в разтвор от 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  в TBS-T за 30 минути при стайна температура на тъмно, последвана от промиване в TBS-T. Неспецифичното свързване на антигени бе подтиснато чрез 5-10% нормални серуми (конски или кози) в TBS-T. Оцветяването за BrdU изисква ДНК в клетките да се денатурира (да стане едноверижна) преди инкубацията с първичното анти тяло. Това бе постигнато чрез нагряване на срезите на 65° C за 2 часа в разтвор на формамид/2×SSC (standard sodium citrate, стандартен натриев цитрат), последвано от инкубация в 2N HCl за 30 минути на 37° C (Kuhn et al, 1996). След това срезите бяха многократно измити в TBS-T и процедурата продължи с блокиране на ендогенната пероксидаза както е обяснено по-горе. Първичните антитела бяха разредени в TBS-TB и срезите – поставени в така получените разтвори за 36-40 часа на 2-8° C.

Впоследствие, срезите бяха трикратно промити в TBS и TBS-T, и инкубирани в разтвор, съдържащ съответно вторичното анти тяло (насочено срещу вида на съответното първично анти тяло и конюгирано с биотин) в TBS-T за 2 часа на стайна температура. След ново измиване, срезите бяха потопени в TBS-T, съдържащ комплекс авидин/пероксидаза (вторичното анти тяло и комплекса авидин/пероксидаза бяха част от кит - ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, САЩ). Реакцията бе визуализирана с разтвор, съдържащ диаминобензидин (Sigma) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.25 mg/mL диаминобензидин в TBS 30-60 секунди. След това реакцията бе преустановена в  $\text{H}_2\text{O}$  и срезите бяха поставени на предметни стъкла, върху които да изсъхнат и прилепнат здраво за около 12 часа. Накрая, срезите върху стъклата бяха дехидратирани във възходяща редица алкохоли и ксилол, след което покрити с изкуствена смола.



#### **4.5. Флуоресцентна имунохистохимия**

Както и пероксидазната, флуоресцентната имунохистохимия бе осъществена по индиректна методика. За разлика от пероксидазната обаче, флуоресцентната имунохистохимия бе използвана едновременно за разкриване на 2 или 3 антигена на един и същи срез (двойна, респ. тройна имунофлуоресценция). За тази цел, антигените бяха последователно визуализирани с вторични антитела, конюгирани за флуорохроми Alexa Fluor 488, 546 и 633 (Molecular Probes, Eugene, OR, САЩ) и TRITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Alexa Fluor 488 излъчва в зеления, Alexa Fluor 546 и TRITC – в червения, а Alexa Fluor 633 – в инфрачервения спектър. Процедурите следваха хронологията на вече описаната мунопероксидазна методика (вкл. денатурацията на ДНК в тъканите), като стъпката блокиране на ендогенна пероксидаза бе пропусната.

Комбинирахме първични антитела от различни видове. За разкриване фенотипа на BrdU-позитивните клетки използвахме най-често плъшето анти-BrdU антитяло в комбинация с миши и/или заешко антитяло. Впоследствие, първичните антитела бяха визуализирани с подходящи (спрямо вида на първичното антитяло) вторични антитела (за 2 часа на стайна температура), свързани с флуорохроми, излъчващи в различни дължини на вълната (напр. Alexa Fluor 488 и TRITC и т.н.). Накрая, срезите бяха промити в TBS, монтирани върху предметни стъкла и включени във водоразтворим медиум (Vectashield, Vector Labs), съдържащ запазващи флуоресценцията реагенти.

#### **4.6. Анализ на препаратите**

Светлинномикроскопският анализ на имунопероксидазните срези бе осъществен чрез микроскоп VX60 (Олимпус, Токио, Япония). BrdU-позитивните (BrdU+) клетки бяха преброени на кодирани срези представляващи серия от всеки 12-ти срез от шийни, гръдни и лумбални сегменти, на всички експериментални групи, подразделени на следните региони:

1. Сиво мозъчно вещество, разделено на три сектора: предни рога, задни рога, зона около *canalis centralis*.
2. Бяло мозъчно вещество: преден сноп, страничен сноп, заден сноп.

Флуоресцентните срези бяха наблюдавани на флуоресцентен микроскоп AxioImager (Carl Zeiss). Двойните и тройни имунофлуоресцентни оцветявания бяха изследвани с лазерен сканиращ конфокален микроскоп (LSM 700, Carl Zeiss). Конфокалният модул бе монтиран към горепосочения флуоресцентен микроскоп. Използвахме 3 лазера с дължини на вълната (350, 488 and 555 nm). Употребата на 2 или 3 различни дължини на вълната позволява едновременна регистрация на сигнали от 2 (респ. 3) флуорохрома едновременно. Излъченият сигнал се улавя от

видеокамера и се преобразува в компютърен образ. Тъй като лазерът позволява използване на лъч с изключително малък диаметър (под 1  $\mu\text{m}$ ), който в същото време да бъде насочен изключително точно, LSM дава възможност за получаване на серийни срези от различна дълбочина на една и съща клетка. Чрез свързването на различни флуорохроми към различни (2 или 3) антители, може да се демонстрира ко-локализацията (или липсата на такава) на 2 или 3 антигена в една и съща клетка чрез генериране на дигитални 3-измерни реконструкции от серийното сканиране на различна дълбочина.

Срезите бяха сканирани с лазера на всеки 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ . Така получените компютърни образи бяха последователно подредени в поредици (image stacks), от който софтуерът на LSM изчислява и генерира ортогонални проекции в равнините  $x$  и  $y$ . Флуорохромите бяха зададени към следните канали на микроскопа: Alexa Fluor 488 - към зеления, Alexa Fluor 546 и TRITC – към червения, Alexa Fluor 633 – към синия. Всички окончателни компютърни образи бяха експортирани в някой от популярните формати (като .tiff) и интегрирани в Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, САЩ).

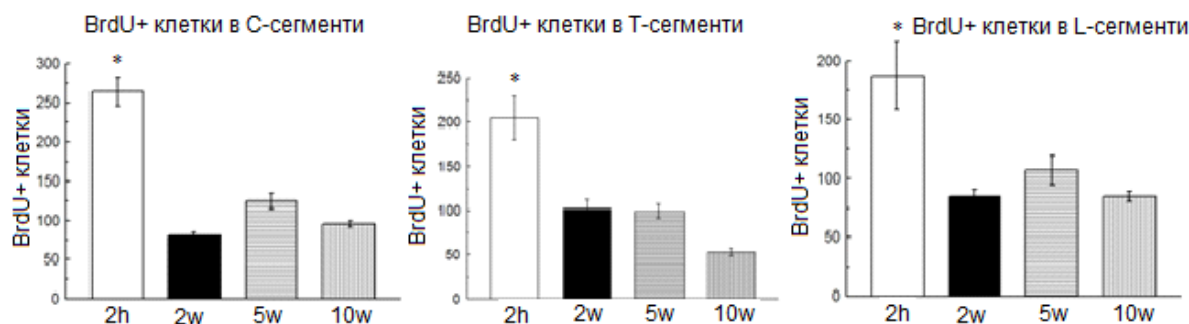
#### **4.7. Статистическа обработка**

Количеството на BrdU-позитивните (BrdU+) клетки беше оценено като общ брой клетки в рамките на всеки отделен срез. Получени бяха данни за всеки от регионите, на които бе разделен гръбначния мозък, както и за среза като цяло, поотделно за шийни, гръдни и поясни гръбначномозъчни сегменти. Освен това, животните бяха разделени в четири експериментални групи според времето на преживяване след BrdU. Статистическата значимост на резултатите бе проверена с еднофакторен анализ на вариациите (one way ANOVA), последван от теста на Tukey-Kramer за определяне статистическата значимост на данните на всяка от експерименталните групи спрямо останалите 3 такива (Tukey-Kramer's *post hoc*). Разликите бяха считани за сигнификантни при  $P < 0.05$ .

## 5. Резултати

### 5.1. Количествен анализ на броя на *de novo* образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с различна преживяемост след апликацията на BrdU.

Осъществихме количествен анализ на броя на BrdU-позитивните (BrdU+) клетки на напречни гръбначномозъчни срези, съответно от шийни (C1-C3), гръдни (Th1-Th3) и лумбални (L1-L3) сегменти. За целта изброихме всички BrdU+ клетки на всеки от оцветените срези, като разделихме гръбначния мозък на зони, както е описано в раздел "Материали и методи". Оценка на общия брой BrdU+ клетки на срез показва сигнификантно увеличение в групата маймуни, жертвани 2 ч. след последната инжекция BrdU, на всички изследвани нива, в сравнение с групите, жертвани на 2-ра, 5-та и 10-седмица след BrdU (Фиг. 5. 1).



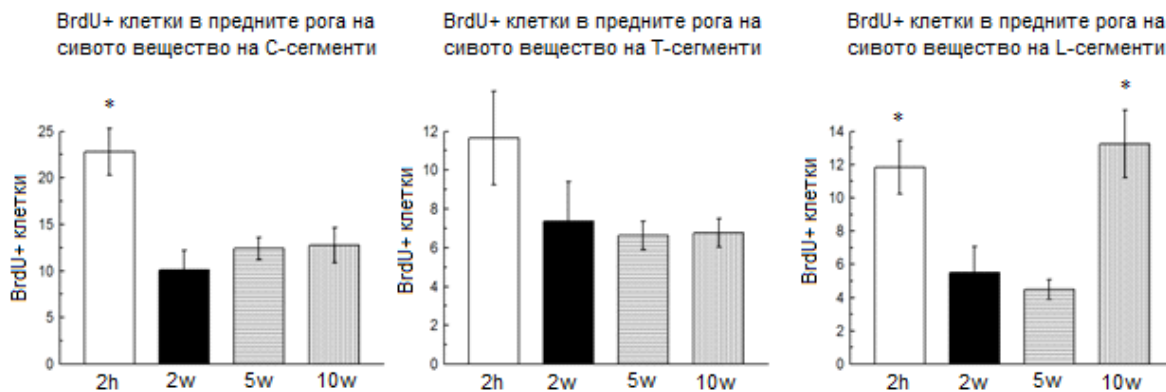
**Фигура 5. 1.** Общ брой BrdU+ клетки на срези от шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназираны на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

За да оценим дали разпределението на BrdU+ клетки по зони запазва тенденцията, наблюдавана при общия брой BrdU+ клетки на срез, осъществихме статистически анализ на BrdU+ клетки по зони в сивото и бяло мозъчно вещество на гръбначния мозък. Отново установихме сигнификантно увеличение на броя BrdU+ клетки в бялото, респ. сивото вещество на срез, на всички изследвани нива, на втория час след BrdU, в сравнение с 2-ра, 5-та и 10-та седмица след BrdU.

Впоследствие разделихме сивото вещество на гръбначния мозък на три сектора: сиво вещество в предните рога, сиво вещество в задните рога и такова в зоната около *canalis centralis*. От получените резултати установихме наличието на по-голям брой клетки, инкорпорирани BrdU, в предните рога на сивото вещество на гръбначния мозък в шийните сегменти на I-ва експериментална група (на 2-ри час) в сравнение със същите гръбначномозъчни сегменти при останалите три групи. За разлика от това, не установяваме сигнификантна разлика в броя на

положителните клетки в предните рога на сивото вещество на гръбначния мозък в гръдните сегменти на 2-ри час, 2-ра, 5-та и 10-та седмица. Установихме сигнификантно увеличение на броя на маркираните клетки в лумбалните сегменти, както на 2-ри час, така и на 10-та седмица (Фиг. 5. 2).

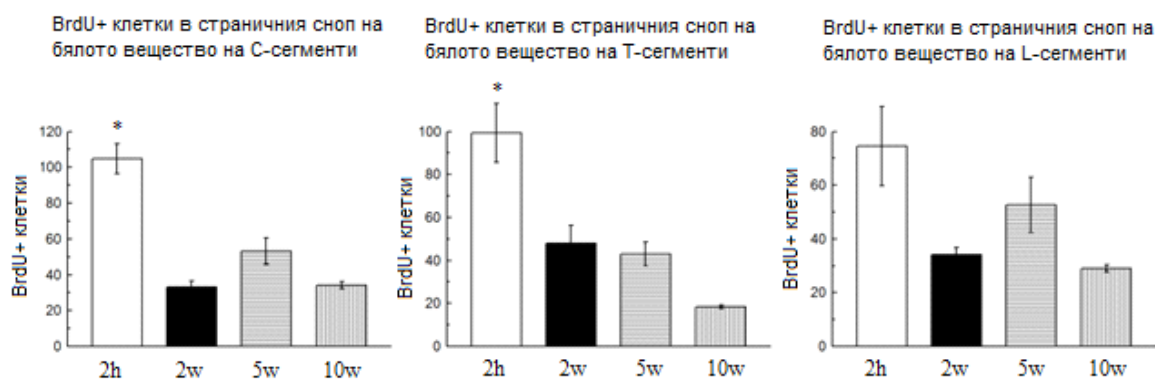
Резултатите, получени при оценката на броя на BrdU+ клетки в задните рога на сивото мозъчно вещество на гръбначния мозък, на всички изследвани нива, показват статистически значимо увеличение на втория час в сравнение с останалите три групи.



**Фигура 5. 2.** Общ брой BrdU+ клетки на срези от предните рога на сивото вещество от шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

В зоната около *canalis centralis*, се наблюдава сигнификантно увеличение на броя на клетките, на 2-рия час спрямо останалите три групи, само на ниво шийни сегменти. При гръдните и лумбалните сегменти на гръбначния мозък не се откри статистически значима разлика в резултатите.

С цел по-детайлен анализ на пролифериращите клетки в бялото вещество на гръбначния мозък, го разделихме на три сектора, като извършихме оценка на броя на BrdU+ клетки в предния, страничния и задния фуникул на всеки срез, на ниво шийни, гръдни и лумбални сегменти в четирите експериментални групи. Подобно на сивото вещество, и в предния сноп на бялото вещество, установяваме сигнификантно увеличение на броя на BrdU+ клетки на втори час в сравнение с останалите три групи, на всички изследвани нива.



**Фигура 5. 3.** Общ брой BrdU+ клетки на срези страничния сноп на бялото вещество от шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

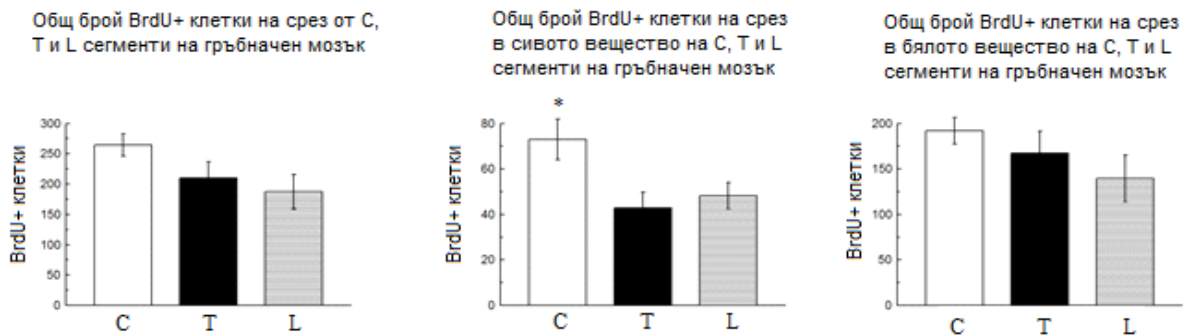
В латералния сноп, статистически значимо повишение на броя на изследваните клетки, на втори час се наблюдава само в шийния и гръдния отдел. Такава разлика не е установена в лумбалния отдел на гръбначния мозък в нито една експериментална група (Фиг. 5. 3).

Аналогична е находката и в задния сноп на бялото мозъчно вещество на гръбначния мозък при всички групи, на всички изследвани нива – не се установи сигнификантно увеличение на BrdU+ клетки.

### **5.2. Количествен анализ на броя на *de novo* образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с един и същи срок на преживяемост след BrdU.**

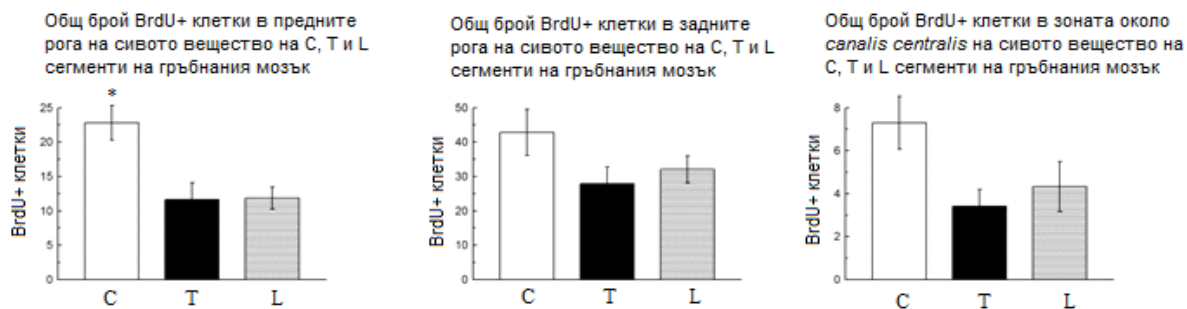
Освен разликата в броя на пролифериращите клетки в различните зони на сивото и бялото вещество в зависимост от времето след инфузията на BrdU, ние оценихме пролиферацията при различните (шийни, гръдни и лумбални) сегменти на гръбначния мозък, при маймуни с една и съща преживяемост след BrdU.

От получените резултати на 2-ри час след BrdU (I-ва експериментална група), установихме, че не се наблюдава статистически значима разлика в общия брой BrdU+ клетки на срез, както и в общия брой BrdU+ клетки в бялото мозъчно вещество между трите изследвани нива на гръбначния мозък. В същото време, бе налице сигнификантно увеличение на общия брой BrdU+ в сивото вещество на шийните в сравнение с гръдните и лумбални сегменти (Фиг. 5. 4).



**Фигура 5. 4.** Общ брой BrdU+ клетки на срези от шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на 2-ри час след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). C, шийен отдел; T, гръден отдел; L, поясен отдел на гръбначния мозък.

При последващото разделяне на сивото вещество на три сектора: предни рога, задни рога и зона около *canalis centralis*, отчитаме че то е за сметка на по-големия брой пролифериращи клетки в предните рога на сивото вещество в шийните сегменти (**фиг. 5. 5**).



**Фигура 5. 5.** Общ брой BrdU+ клетки в сивото вещество на шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на 2-ри час след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). C, шийен отдел; T, гръден отдел; L, поясен отдел на гръбначния мозък.

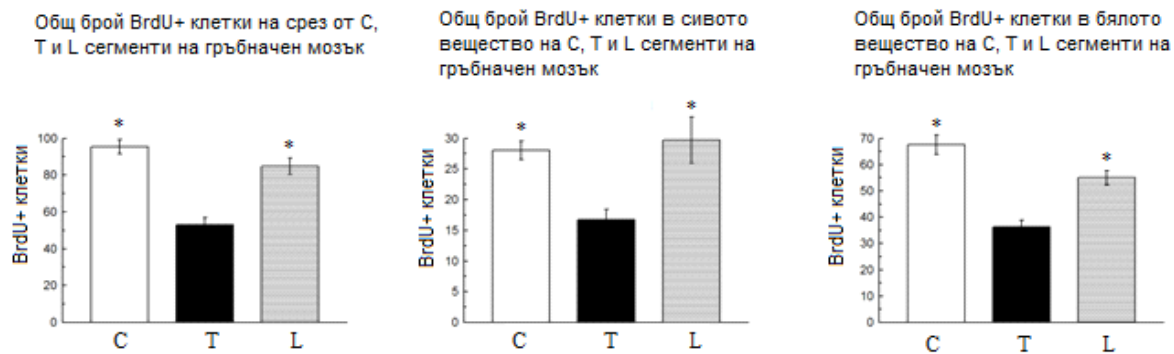
При подразделянето на бялото вещество на три сектора: преден сноп, страничен сноп и заден сноп, не отчитаме сигнификантна разлика в броя на пролифериращите клетки, на трите изследвани нива.

При аналогичен анализ на резултатите, получени на 2-рата седмица (II-ра експериментална група), установяваме липса на сигнификантна разлика в броя на пролифериращите клетки общо на срез, както и при разделянето на гръбначния мозък на сиво и бяло мозъчно вещество, така и при подразделянето им на сектори на всички изследвани нива.

На 5-та седмица след BrdU (III-та експериментална група), също не

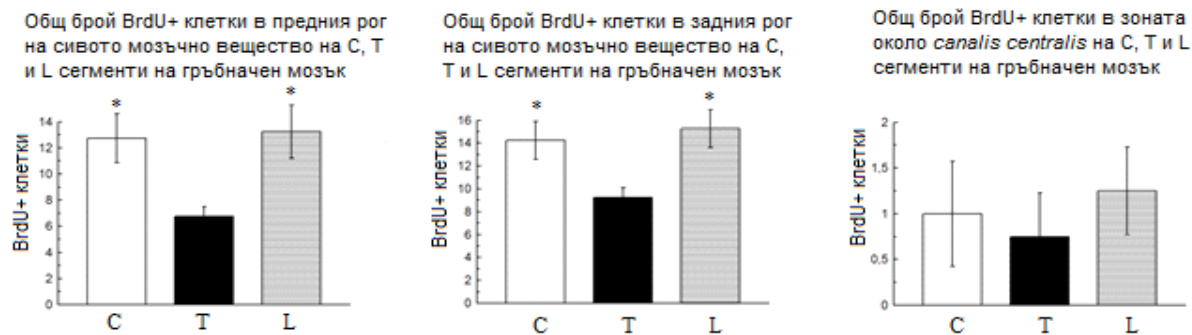
установихме разлика в общия брой клетки на срез, както и при разделянето на гръбначния мозък на сиво и бяло вещество на трите изследвани нива. Наблюдаваше се сигнификантно увеличение на BrdU+ клетки в предните рога на сивото вещество в шийните в сравнение с гръдните и лумбални сегменти. Сигнификантно повишен брой пролифериращи клетки са отчетени и в предния сноп на бялото вещество в шийния отдел на гръбначния мозък .

На 10-та седмица след BrdU (IV експериментална група), установихме сигнификантно увеличение на общия брой BrdU+ клетки на срези както в шийния, така и в лумбалния отдел на гръбначния мозък. Аналогични са резултатите и при подразделяне на гръбначния мозък на сиво и бяло вещество (Фиг. 5. 6).

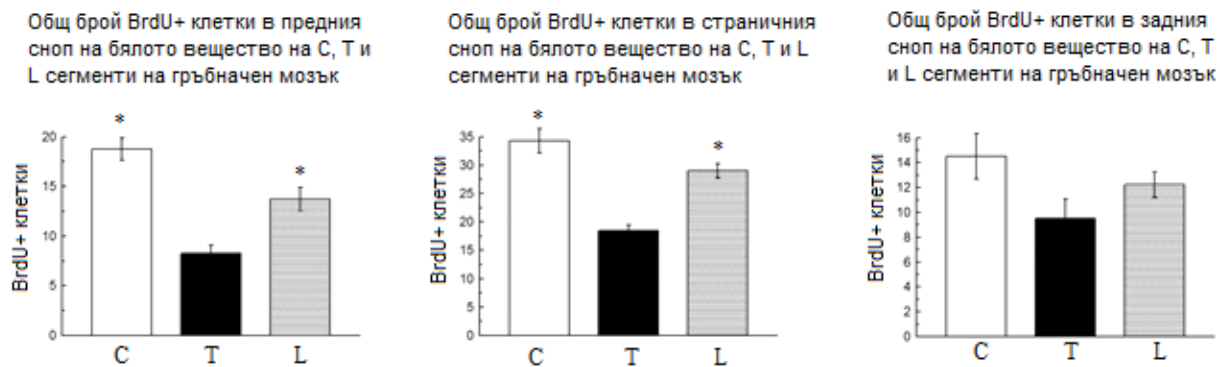


**Фигура 5. 6.** Общ брой BrdU+ клетки на срези от шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на 10-та седмица след последна BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). С, шийен отдел; Т, гръден отдел; L, поясен отдел на гръбначния мозък.

При подразделянето на сивото мозъчно вещество на съответните три сегмента, установихме увеличен брой пролифериращи клетки в предните и задни рога в шийния и лумбалния отдел на гръбначния мозък. В зоната около *canalis centralis* липсва сигнификантна разлика в броя на BrdU+ клетки на всички изследвани нива. (Фиг. 5. 7).



**Фигура 5. 7.** Общ брой BrdU<sup>+</sup> клетки в сивото вещество на шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на 10-та седмица след последна BrdU инжекция. \*, P<0.05, спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). С, шиен отдел; Т, гръден отдел; L, поясен отдел на гръбначния мозък.



**Фигура 5. 8.** Общ брой BrdU<sup>+</sup> клетки в бялото вещество на шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на 10-та седмица след последната BrdU инжекция. \*, P<0.05, спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). С, шиен отдел; Т, гръден отдел; L, поясен отдел на гръбначния мозък.

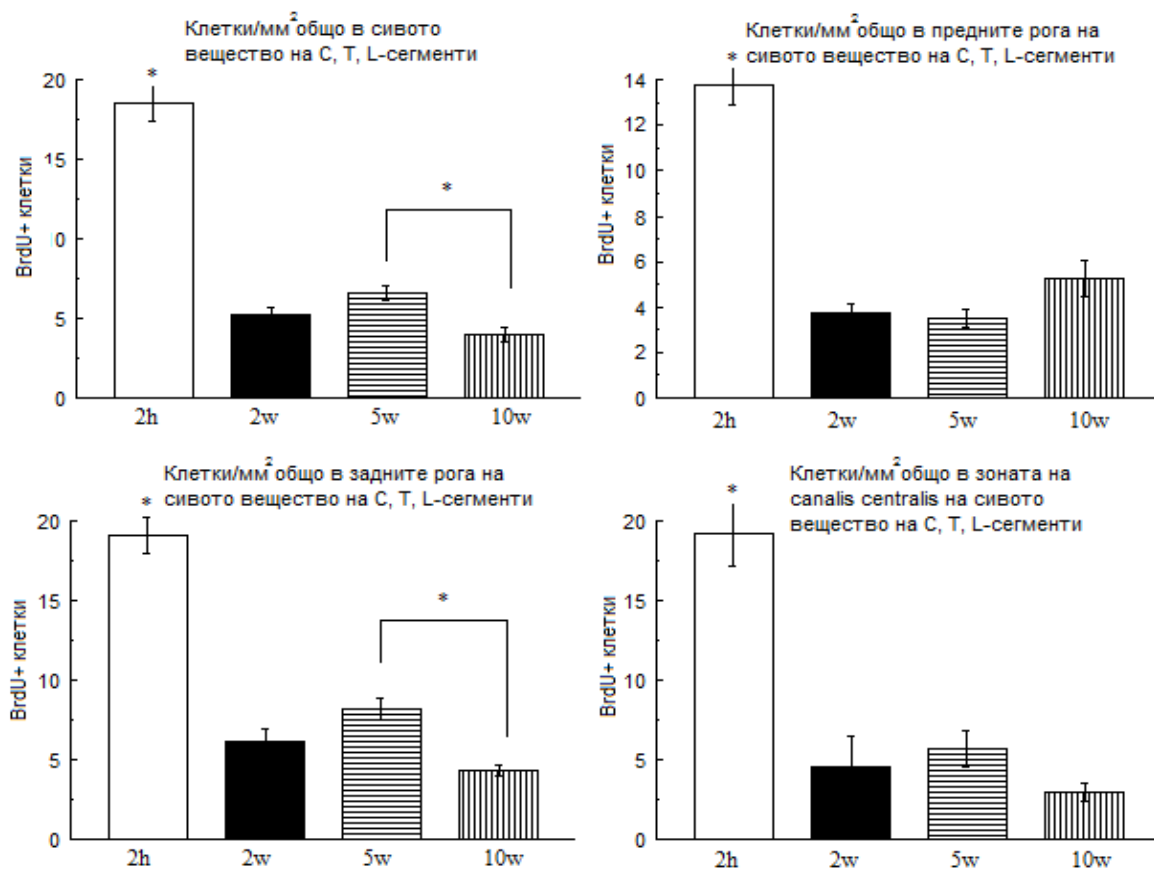
В бялото мозъчно вещество, при подразделянето му на три сектора, отново установихме сигнификантна разлика в броя на пролифериращите клетки, в предния и страничния сноп, на шиен и лумбален отдел. Такава не бе установена в задния сноп на всички изследвани нива (Фиг. 5. 8).

### 5.3. Гъстота на *de novo* образувани клетки в шийни, гръдни и лумбални сегменти при маймуни с различна преживяемост след апликацията на BrdU.

Сравнихме гъстотата, дефинирана като брой клетки/мм<sup>2</sup> на клетките в гръбначния мозък на възрастните животни от четирите експериментални групи: общо на всички изследвани нива (С, Т, L-сегменти) и в рамките на секторите които го разделихме (предни рога, задни рога, паренхим около централния канал на сивото вещество, преден, страничен и заден сноп на бялото вещество). В резултат на анализа установихме, че в сивото вещество, гъстотата на BrdU<sup>+</sup> клетки е най-голяма при 1-ва експериментална група (2h след BrdU), която е сигнификантно увеличена в сравнение с останалите три експериментални групи. Наблюдавахме известно намаление на гъстотата на BrdU<sup>+</sup> клетки при животните от 2-ра експериментална група (2 седмици след BrdU), докато при 3-та група (5 седмици след BrdU) отново се наблюдаваше нарастване на плътността на *de novo* образуваните клетки, но не в такава голяма степен както при маймуните, евтаназирани на 2-ри час след апликацията. При 4-та експериментална група (10



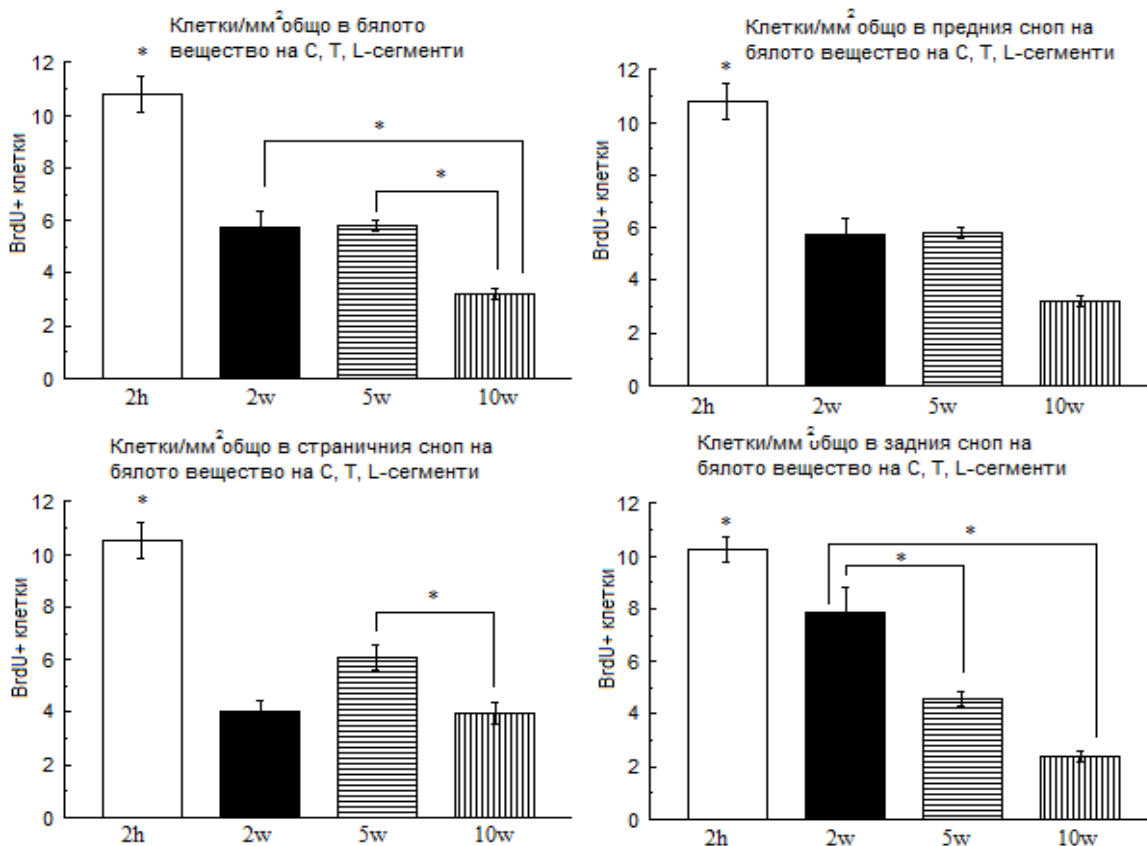
седмици след BrdU) отново се наблюдаваше спад на стойностите. Между приматите от 2-ра и 4-та опитна група не бе установена статистически значима разлика на плътността в клетките. При разделяне на сивото вещество на изследваните сектори, установихме че тенденцията за най-голяма концентрация на клетки на 2-ри час след инфузията се запазва за отделните регион: предни рога, задни рога и зона около *canalis centralis*. Повишаването на плътността на клетките в сивото вещество на гръбначния мозък на 5-ти час е за сметка на по-високата им концентрация в задните рога. Не установихме сигнификантна разлика на изследвания показател в предните рога на сивото вещество както и в паренхимата около *canalis centralis* при 2-ра, 3-та и 4-та експериментална група (Фиг. 5. 9).



**Фигура 5. 9.** Съотношение брой клетки/мм<sup>2</sup> в означените сектори на сивото вещество на шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

При аналогичен анализ на гъстотата на BrdU+ клетки в бялото вещество, отново получихме най-голяма плътност на 2-рия час след BrdU (Фиг. 5. 10). В бялото мозъчно вещество като цяло след намаляване плътността на клетките на 2-

ра седмица, до 5-та седмица плътността остава константна, след което се наблюдава втори спад. В предния сноп, след понижаване стойността на изследваната величина на 2-рата седмица, не установихме динамика в по-късните времеви интервали след BrdU (на 5-та и 10-та седмица). Повторно повишение на гъстотата на BrdU+ клетки на 5-та седмица, установихме само в страничния сноп на бялото вещество на гръбначния мозък. В задния сноп, има рязко намаляване на концентрацията на клетките при 3-та експериментална група, в следствие не установихме сигнификантна разлика между маймуните на 5-та и 10-та седмица след инфузията с BrdU (Фиг. 5. 10).



**Фигура 5. 10.** Съотношение брой клетки/мм<sup>2</sup> в означените сектори на бялото вещество на шийни, гръдни и поясни сегменти на възрастни маймуни, етаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица.

Сравнихме плътността на клетките в гръбначния мозък на възрастните опитни животни от четирите експериментални групи поотделно и на всички изследвани нива (С, Т, L-сегменти). При анализа на резултатите, получени за сивото мозъчно вещество на гръбначния мозък, установихме отново най-висока

концентрация на клетки при приматите от 1-ва експериментална група (на 2-ри час след BrdU) на всички изследвани нива. На 2-рата седмица се наблюдава намаляване на съотношението брой клетки/mm<sup>2</sup>, като тенденцията се запазва и в последствие на 5-та и 10-та седмица, в С и Т сегменти. Само в сивото вещество на поясните сегменти на гръбначния мозък се наблюдава втори спад на 10-та седмица.

След обработка на резултатите и по секторите, на които бе разделено сивото вещество на гръбначния мозък отново установихме най-висока концентрация на клетки при маймуните, евтаназирани на 2-рия час след BrdU във всички изследвани зони. В предните рога, задните рога и зоната на паренхима около *canalis centralis*, след спад на съотношението брой клетки/mm<sup>2</sup> на 2-ра, седмица наблюдаваме повторно повишение на 5-та седмица и нов спад на 10-та седмица след инфузията. Не установихме статистически значима разлика при експерименталните животни от 2-ра и 4-та експериментална група.

При обработка на резултатите за гръдни сегменти установихме, че след спад на плътността на клетките на 2-ра седмица, тенденцията се запазва и на по-късните етапи от експеримента (5-та и 10-та седмица) във всички изследвани зони на сивото вещество на гръбначния мозък.

Подобна тенденция се наблюдава и в зоната на централния канал на лумбалните сегменти. В предните рога на сивото мозъчно вещество след намаляване концентрацията на клетките на 2-рата седмица се наблюдава повторно намаление на 5-та седмица и ново повишаване на 10-та седмица след инфузията на тимидиновия аналог. Стойностите, които достига съотношението брой клетки/mm<sup>2</sup>, са съизмерими с тези, получени на 2-ра седмица, но все пак са по-ниски от тези в 1-ва експериментална група (2-ри час). В задните рога на сивото мозъчно вещество клетъчната концентрация остава постоянна до 5-та седмица, след което се наблюдава спад на 10-та седмица (Фиг. 5. 11).



**Фигура . 5. 11.** Плътност на *de novo* образувани клетки в сивото вещество на предни рога, задни рога и паренхим около *canalis centralis*, в поясни сегменти на възрастни маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). *h*, час; *w*, седмица.

При аналогичен анализ на резултатите, получени за бялото вещество като цяло, както и за секторите, на които го разделихме (преден, страничен и заден сноп), в шийните сегменти на възрастните опитни животни от четирите групи, отново получихме най-голяма гъстота на клетките при първа експериментална група. След спад в стойността на изследваната величина (брой клетки/mm<sup>2</sup>) на 2-ра седмица, на 5-та седмица, подобно на сивото вещество, отново се наблюдава повишаване на концентрацията на клетките както и нов спад на 10-та седмица. Единствено в задния сноп на бялото вещество след спад на 2-рата седмица, стойността се запазва и на 5-та седмица, след което следва ново понижение на 10-та седмица.

При обработка на данните, получени за гръдните сегменти на гръбначния мозък, установихме, че в бялото вещество като цяло, както и в задният му сноп плътността на *de novo* формираните клетки е най-висока на 2-рия час и се запазва такава и на втора седмица след въвеждането на BrdU. Пет седмици по-късно следва спад в съотношението брой клетки/mm<sup>2</sup>. То остава непроменено и на 10-та седмица. В предния сноп на бялото мозъчно вещество се наблюдава стъпаловидно намаляване на концентрацията на новоформираните клетки. Тя отново е най-висока при приматите от първа експериментална група, следва спад на 2-ра седмица, но не установихме статистически значима разлика между животните от двете експериментални групи. Наблюдавахме втори спад в изследваната величина на 5-та седмица (трета експериментална група). Доказахме наличието на сигнификантна разлика между първа и трета група и съответно липса на такава между втора и трета група. Бе установен трети спад в плътността на клетките на 10-та седмица (четвърта експериментална група), а концентрацията на клетките-сигнификантно по-ниска в сравнение с останалите три групи възрастни опитни животни. В страничния сноп на бялото мозъчно вещество на гръдните сегменти, концентрацията на новообразуваните клетки е най-висока на 2-рия час, след което следва намалване на 2-ра седмица, след което тя остава непроменена на 5-та и 10-та седмица.

При аналогичен анализ на съотношението брой клетки/mm<sup>2</sup> за бялото вещество като цяло на лумбални сегменти, както и на предния и страничния сноп, установихме отново, че е най-голямо на 2-рия час, след което на 2-рата седмица спада и остава непроменено на 5-та и 10-та седмица. Само в задния сноп, подобно на гръдните сегменти, концентрацията на клетките е приблизително еднакво

висока както на 2-рия час, така и на 2-рата седмица, следва спад на 5-та седмица, след което величината остава непроменена на 10-та седмица.

**5. 4. Сравнение на броя на *de novo* образувани клетки в сивото и бялото мозъчно вещество на шийни, гръдни и лумбални сегменти, на гръбначен мозък при възрастни маймуни, евтаназирани на различни интервали след апликацията на BrdU.**

За всяка една от четирите експериментални групи, измерихме площта на сивото и бялото мозъчно вещество на шийни, гръдни и лумбални сегменти, а след това ги сравнихме. Сравнихме също и броя на *de novo* образуваните клетки в изследваните зони на гръбначния мозък на всички нива при определените опитни групи. Намерихме и плътността на новообразуваните клетки в сивото и бялото вещество на С, Т и L сегменти и направихме същото сравнение.

За всички експериментални групи установихме, че на всички изследвани нива площта на бялото вещество е по-голяма от тази на сивото вещество на гръбначния мозък.

Аналогично намерихме и по-голям брой клетки в бялото мозъчно вещество в сравнение със сивото мозъчно вещество при четирите експериментални групи на всички изследвани нива.

При анализ на гъстотата на *de novo* образуваните клетки на  $\text{mm}^2$  установихме, че тя е по-голяма в сивото мозъчно вещество при шийни и гръдни сегменти, но не установихме сигнификантна разлика в клетъчната плътност в сивото и бялото вещество на поясни сегменти при приматите, евтаназирани на 2-рия час след апликацията на BrdU.

При аналогичен анализ в двете зоните на интерес, при животните, жертвани на 2-ра седмица установихме по-голяма концентрация на новообразувани клетки в бялото вещество на гръбначния мозък само на нивото на гръдните сегменти и липса на сигнификантна разлика при шийни и поясни сегменти.

При анализ на гъстотата на новоформираните клетки при маймуните от 3-та експериментална група, бе отчетено статистически значимо увеличение единствено в сивото мозъчно вещество на лумбалните сегменти, в сравнение с бялото вещество на същото ново. В шийни и гръдни сегменти не бе установена сигнификантна разлика.

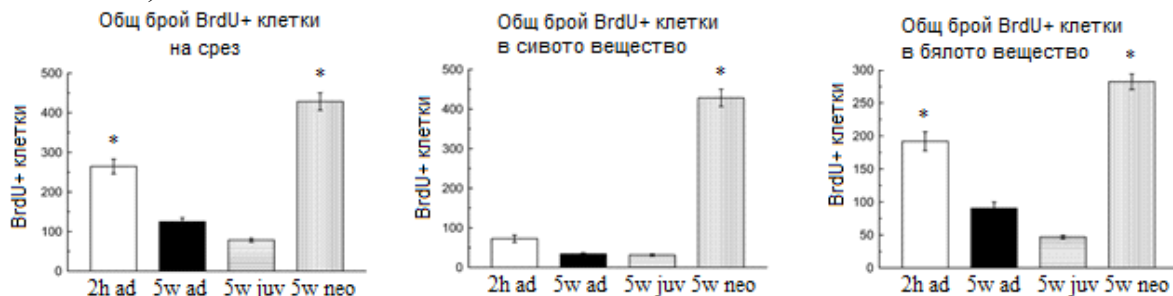
Анализирайки плътността на клетките на  $1 \text{ mm}^2$  при приматите, жертвани на 10-та седмица, установихме, че тя е по-голяма в сивото вещество на шийни и гръдни сегменти на гръбначния мозък и не намериме разлика в концентрацията на *de novo* образувани клетки в лумбалните сегменти.

**5. 5. Сравнение на броя на *de novo* образувани клетки в различните зони на интерес, в шийни, сегменти, на гръбначен мозък при възрастни маймуни, евтаназирани на 2-ри час и 5-та седмица след апликацията BrdU, ювенилни и новородени животни, жертвани на 5-та седмица след BrdU.**

След оценка на пролиферацията на различните нива (шийни, гръдни и лумбални сегменти) на гръбначния мозък при маймуни с една и съща преживяемост след BrdU, установихме сигнификантно увеличение на общия брой BrdU+ клетки в сивото вещество на шийните сегменти при опитните животни, евтаназирани 2h след инфузията, спрямо останалите три експериментални групи (2-ра седмица, 5-та седмица, 10-та седмица). При последващото разделяне на сивото вещество на три сектора - предни рога, задни рога и паренхим около *canalis centralis* - отчитаме, че то е за сметка на по-големия брой пролифериращи клетки в предните рога на сивото вещество.

По аналогичен начин осъществихме количествен анализ на броя на BrdU+ клетки на напречни гръбначномозъчни срези от шийни (C1-C3) сегменти на ювенилни (1 година) и новородени (1 месец) експериментални животни, евтаназирани на 5 седмица след BrdU инфузията. Получените резултати сравнихме с тези от възрастните екземпляри от I-ва и III-та експериментална група.

Анализът показва най-голям общ брой пролифериращи клетки на срезове при новородените маймуни, следвани от възрастните екземпляри, умъртвени на 2-рия час след BrdU. Не получихме сигнификантна разлика между ювенилните животни и възрастните такива от III-та експериментална група (5 седмици). Тази тенденция се запази и при оценка на общия брой *de novo* образувани клетки в бялото мозъчно вещество в гръбначния мозък. В сивото мозъчно вещество сигнификантно увеличение бе установено само при новородените опитни животни (Фиг. 5. 12).



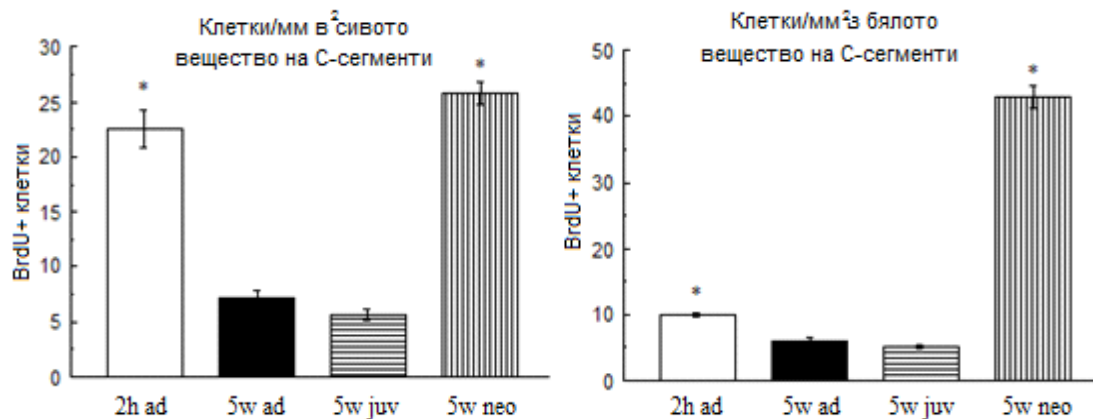
**Фигура 5.12.** Общ брой BrdU+ клетки в цялостен на срез, само в сиво мозъчно вещество и само в бяло мозъчно вещество и на срези от шийни сегменти на възрастни, ювенилни и новородени маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица; ad- възрастни, juv- ювенилни, neo- новородени.

При разделянето на сивото вещество на гръбначния мозък на три сектора: предните рога, задните рога и паренхим в зоната около *canalis centralis*, отново установихме най-голям брой BrdU+ клетки при новородените маймуни във всички изследвани сектори. Сигнификантно повишение на броя клетки в задните рога на сивото мозъчно вещество се наблюдава само при опитните животни от I-ва експериментална група (2h след BrdU).

След разделянето на бялото вещество на гръбначния мозък на три сектора, извършихме оценка на броя на BrdU+ клетки в предния, страничния и задния сноп на срези на ниво шийни сегменти в четирите експериментални групи. Получихме резултати, аналогични на предходните, т. е. най-висок брой на *de novo* образувани клетки при неонаталните примати, следвани от възрастните животни от първа експериментална група (2h след BrdU). Отново не бе установена сигнификантна разлика между възрастните маймуни, евтаназирани на 5-та седмица и тези на възраст 1 година.

В последствие измерихме площта на сивото и бялото вещество, както и зоните, на които са разделени. Както очаквахме, установихме, че тя е най-голяма при възрастните опитни животни, а съответно е най-малка при новородените.

При анализ на гъстотата на BrdU+ клетки установихме най-висока такава при новородените маймуни, както и при опитните животни, евтаназирани на 2-рия час след инфузията. При животните, умъртвени на 5-та седмица и младите екземпляри, не намерихме статистически значима разлика (Фиг. 5. 13).



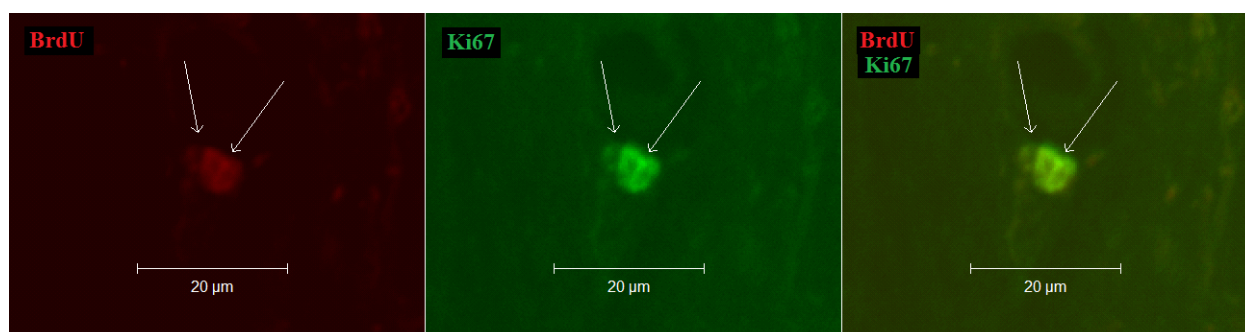
**Фигура 5. 13.** Общ брой BrdU+ клетки в сивото и бялото мозъчно вещество, на срези от шийни сегменти на възрастни, ювенилни и новородени маймуни, евтаназирани на указаните интервали след последната BrdU инжекция. \*,  $P < 0.05$ , спрямо останалите интервали след BrdU (Tukey-Kramer тест). h, час; w, седмица; ad- възрастни, juv- ювенилни, neo- новородени

## 5. 6. Доказване селективността на BrdU като пролиферативен маркер.

След като доказахме наличието на BrdU<sup>+</sup> клетки в различните зони на гръбначния мозък, изчислихме тяхната гъстота и брой, допълнително проверихме селективността на BrdU като пролиферативен маркер чрез двойно оцветяване за BrdU и друг признат маркер за делящи се клетки – Ki67 (Scholzen and Gerdes, 2000). Както BrdU, така и Ki67 се позитивира в ядрото на клетките.

Двойни оцветявания с BrdU в различните региони на интерес при опитните животни, евтаназирани на 2-ри час след BrdU (краткосрочна група) показаха, че мнозинството (около 80%) BrdU<sup>+</sup> клетки са и Ki67<sup>+</sup>, а съответно около 20% от BrdU<sup>+</sup> клетки бяха Ki67-негативни (Ki67<sup>-</sup>) (Фиг. 5. 14).

При аналогичен анализ на дългосточните експериментални групи, включващи маймуни, евтаназирани на 2-ра, 5-та и 10-та седмица след апликация на тимидиновия маркер, установихме че едва 25% от всички BrdU<sup>+</sup> клетки са Ki67<sup>+</sup>.



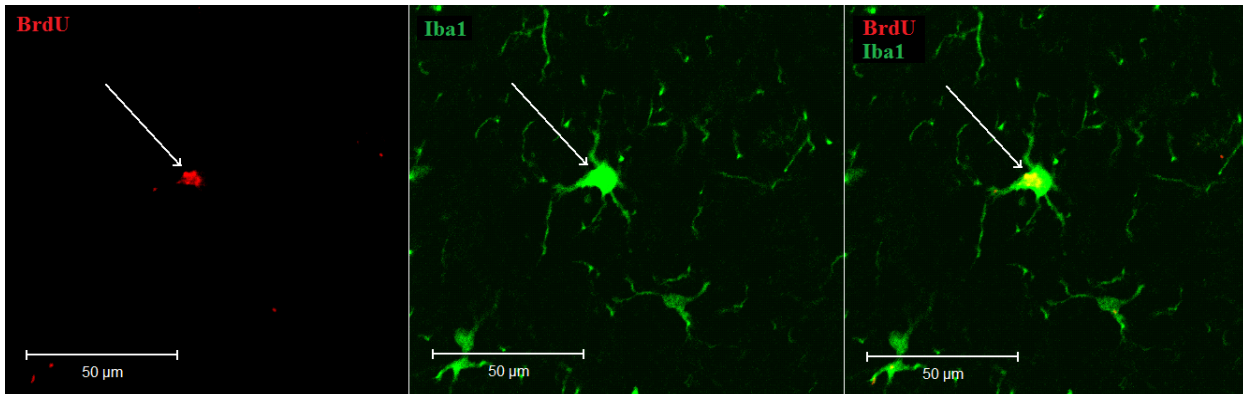
**Фигура 5. 14.** Двойно BrdU/Ki67 имунофлуоресцентно оцветяване в зоната около *canalis centralis* на сивото мозъчно вещество на срез от шийен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелки са посочени BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> клетки, образуващи дублет.

## 5.7. Имунохистохимично изследване на пролиферацията на микроглия, глиални прогенитори и глиални клетки в сивото и бялото вещество на гръбначния мозък.

При изследване на фенотипа на BrdU<sup>+</sup> клетки, използвахме няколко глиални маркера, за да класифицираме *de novo* образуваните клетки. Потърсихме данни за инкорпориране на BrdU в микроглиални клетки. Използвахме оцветявания за BrdU и Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1), маркиращ активирана микроглия. Това беше най-многобройната клетъчна група както при краткосрочната (22%), така и при дългосрочната (36%) експериментални групи

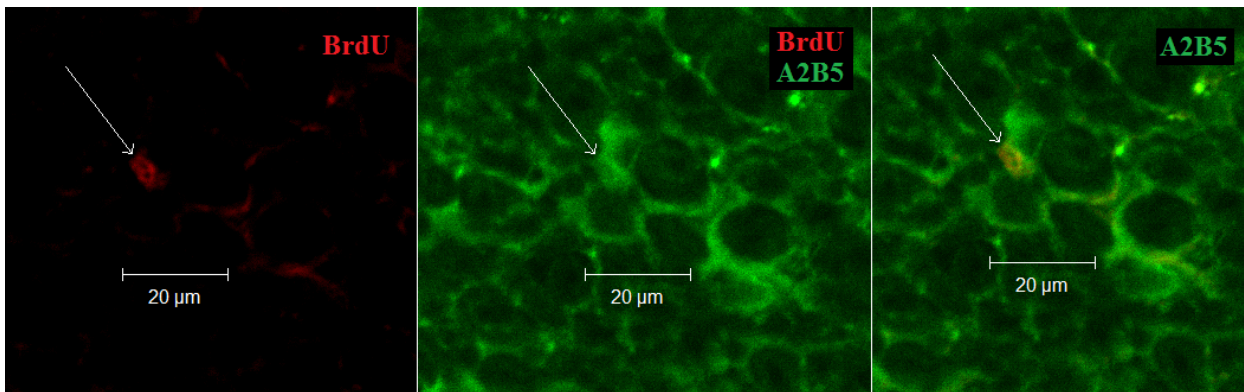


ЖИВОТНИ (Фиг. 5. 15).

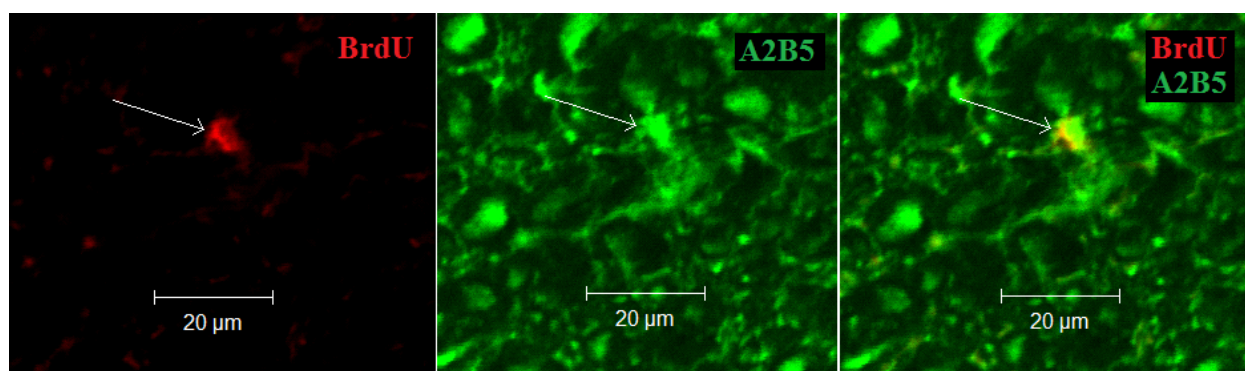


*Фигура 5. 15. Двойно BrdU/Iba1 имунофлуоресцентно оцветяване в преден рог на сивото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, етанализирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена BrdU+/Iba1+ клетка.*

Потърсихме данни за наличие на глиални прогениторни клетки. За целта използвахме маркера A2B5, който се инкорпорира в клетки в стадий бипотентен глиален прогенитор (олигодендроцитен или астроцитен). Наличието на клетки, експресиращи едновременно BrdU и A2B5 (BrdU+/A2B5+) в около 5% от BrdU+ клетки, бе доказано както в краткосрочната експериментална група, така и в дългосрочната такава (Фиг. 5. 16 а, б).



*Фигура 5. 16 а. Двойно BrdU/A2B5 имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, етанализирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелки са посочени BrdU+/A2B5+ клетки.*

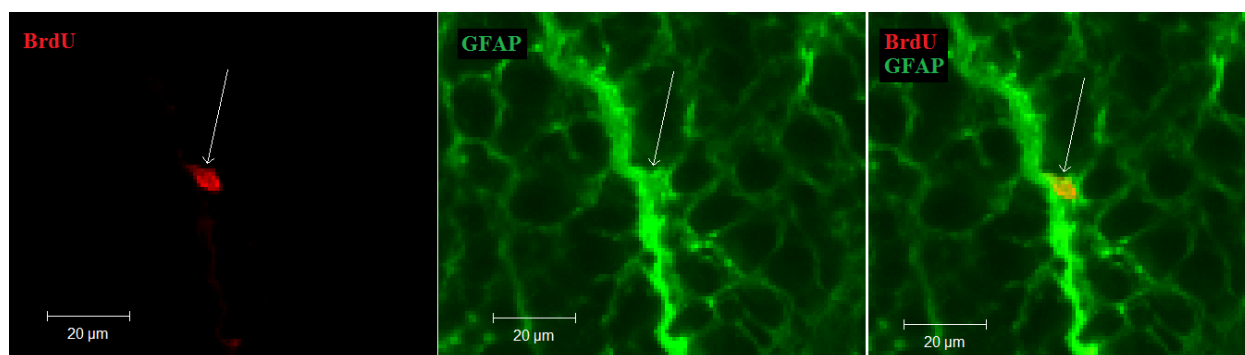


**Фигура 5. 16 б.** Двойно BrdU/A2B5 имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 5-та седмица след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена BrdU+/A2B5+ клетка.

Наличието на BrdU+ олигодендроцити бе доказано чрез използването на маркера O4, специфичен за ранните стадии на олигодендрогенезата (Pistollato et al., 2007). BrdU+/O4+ клетки са в ранна фаза на диференциация и представляват 5% от популацията на новообразуваните клетки, както в експерименталната група с кратка продължителност на живот, така и в дългосрочната група.

Освен олигодендроцитна и микроглиалната пролиферация, ние изследвахме и астроглиалната такава. Астроцитите бяха оцветени с антитела срещу интермедиерния филамент GFAP (glial fibrillary acidic protein).

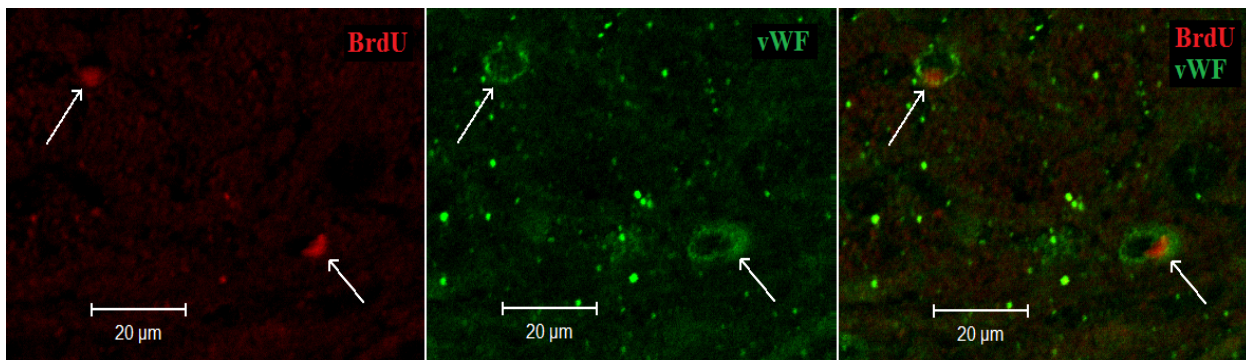
При краткосрочната експериментална група броят на двойнопозитивните клетки (BrdU+/GFAP+) е под 1%, докато при опитните животни с дълга преживяемост е около 7%. При двете експериментални групи двойнопозитивните клетки са съсредоточени в бялото мозъчно вещество на гръбначния мозък и липсват такива в сивото мозъчно вещество (**Фиг. 5. 17**).



**Фигура 5. 17.** Двойно BrdU/GFAP имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена BrdU+/GFAP+ клетка.

Осъществихме и двойно маркиране на *de novo* образувани клетки (BrdU+) с маркер за ендотелни клетки, като за целта използвахме Von Willebrand factor (vWF) (Park et al., 2004). Установихме, че както при краткосрочната (20%), така и при дългосрочната опитна група (30%) двойно позитивните клетки (BrdU+/vWF+) са вторите по честота след BrdU+/Iba1+ клетки (фиг. 5. 18).

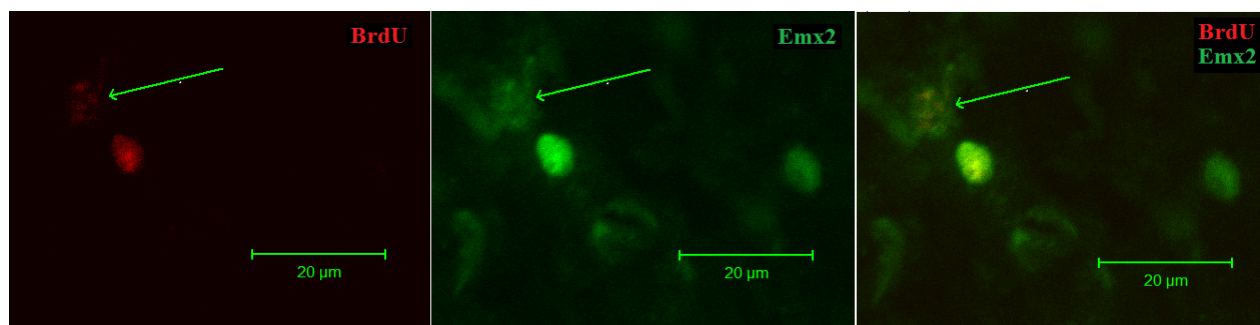
Изследвахме пролиферацията на невронални прекурсори чрез маркера  $\beta$ -tubulin, class III ( Lee et al., 1990; Pancea et al., 2001), а антигенът Neuronal Nuclei (NeuN) (Mullen et al., 1992) бе използван като маркер за неврони. Селективността на NeuN към невроните бе потвърдена от редица изследвания, вкл. такива при маймуни (Gould et al., 1999, 2001; Kornack and Rakic 1999; 2001). Не установихме ко-локализация нито в краткосрочната, нито в дългосрочната експериментална група.



**Фигура 5. 18.** Двойно BrdU/vWF имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелки са посочени BrdU+/vWF+ клетки.

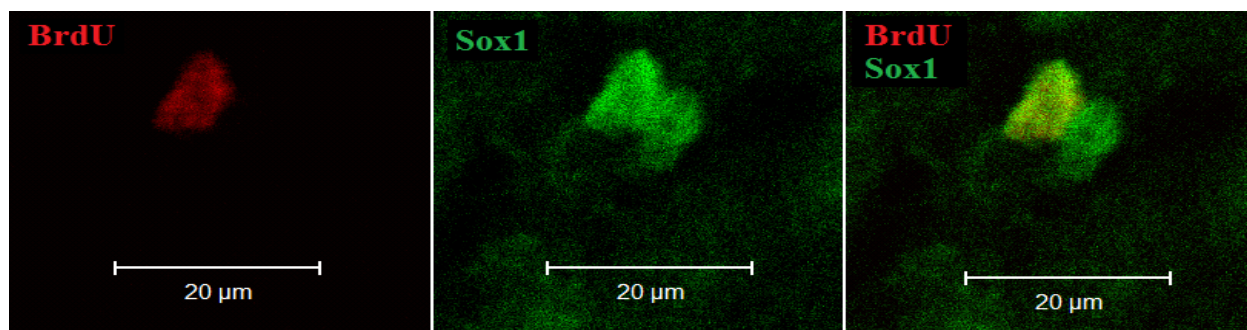
### **5.8. Имунохистохимично изследване на транскрипционните фактори в сивото и бялото вещество на гръбначния мозък.**

Около 47% от BrdU+ клетки при опитните животни, евтаназирани на 2-рия час след инфузията (краткосрочна експериментална група) и приблизително 17% BrdU+ клетки при експерименталните маймуни, евтаназирани на 2-ра, 5-та и 10-та седмица (опитна група с дълга преживяемост), не бяха причислени към нито една от изследваните клетъчни популации. За да ги идентифицираме, предприехме двойно маркиране с различни транскрипционни фактори, които се експресират в ембрионалните прогенитори- Sox1, Sox2, Smo, Shh, Emx2, Ngn1, Ngn2, Olig1, Olig2, Olig3. В най-висок процент при краткосрочната експериментална група установихме BrdU+/Emx2+ двойнопозитивни клетки (фиг. 5. 19).

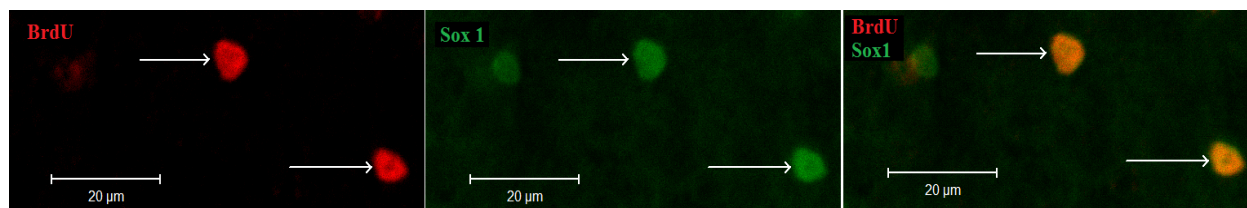


**Фигура 5. 19.** Двойно *BrdU/Emx2* имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шийен сегменти на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с *BrdU*. Със стрелка е посочена *BrdU*<sup>+</sup>/*Emx2*<sup>+</sup> клетка.

Други транскрипционни фактори, които анализирахме бяха *Sox1* и *Sox2*. Установихме че *BrdU*<sup>+</sup>/*Sox1*<sup>+</sup> клетки се срещат както в краткосрочната, така и в дългосрочната група опитни животни (**фиг. 5. 20**). Освен това наблюдавахме двойно позитивни клетки в сивото и бялото вещество на гръбначния мозък. *BrdU*<sup>+</sup>/*Sox2*<sup>+</sup> клетки се срещат в много малък процент само при експерименталните маймуни, евтаназирани на 2-рия час след апликацията на тимидиновия маркер и то само в бялото вещество (**фиг. 5. 21**).

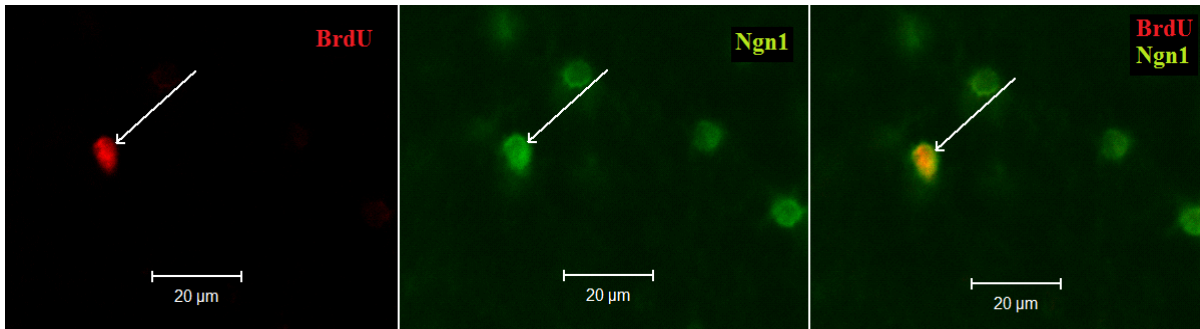


**Фигура 5. 20.** Двойно *BrdU/Sox1* имунофлуоресцентно оцветяване в преден рог на сивото мозъчно вещество на срези от шийни сегменти на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с *BrdU*. Със стрелка са посочени *BrdU*<sup>+</sup>/*Sox1*<sup>+</sup> клетки, образувящи дублет.



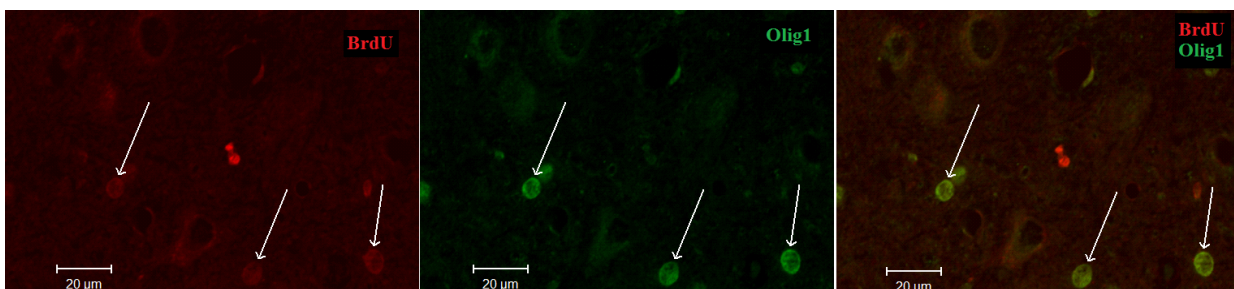
**Фигура 5. 21.** Двойно *BrdU/Sox1* имунофлуоресцентно оцветяване в заден сноп на бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, етанализирана на 2-ри час след инфузия с *BrdU*. Със стрелки са посочени *BrdU+/Sox1+* клетки.

Установихме колокализация на *Ngn1* с *BrdU* (*BrdU+/Ngn1+* клетки) (**фиг. 5. 22**), но липса на колокализация при двойно маркиране с *Ngn2* (*BrdU+/Ngn2-*клетки).



**Фигура 5. 22.** Двойно *BrdU/Ngn1* имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, етанализирана на 2-ра седмица след инфузия с *BrdU*. Със стрелка е посочена *BrdU+/Ngn1+* клетка.

При двойно маркиране на *BrdU* позитивните клетки с олигодендроцитните транскрипционни фактори *Olig1*, *Olig2*, *Olig3*, установихме, че *BrdU+/Olig1+* клетки (**фиг. 5. 23**), както и *BrdU+/Olig2+* клетки се откриват само в бялото мозъчно вещество на опитните животни, етанализирани на 2-рия час след инфузия с тимидиновия маркер. *BrdU+/Olig3+* клетки се наблюдават както в бялото, така и в сивото вещество на гръбначния мозък при маймуните от същата група.

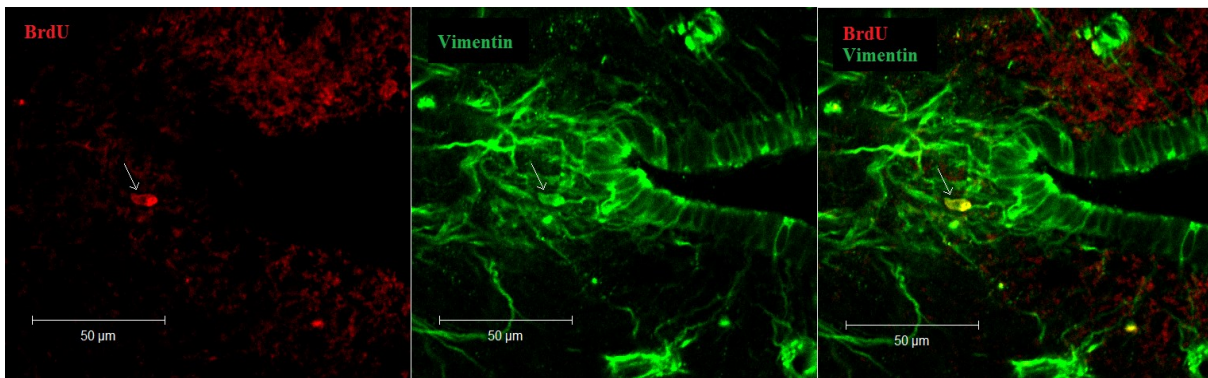


**Фигура 5. 23.** Двойно *BrdU/Olig1* имунофлуоресцентно оцветяване в бялото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, етанализирана на 2-ри час след инфузия с *BrdU*. Със стрелки са посочени *BrdU+/Olig1+* клетки.

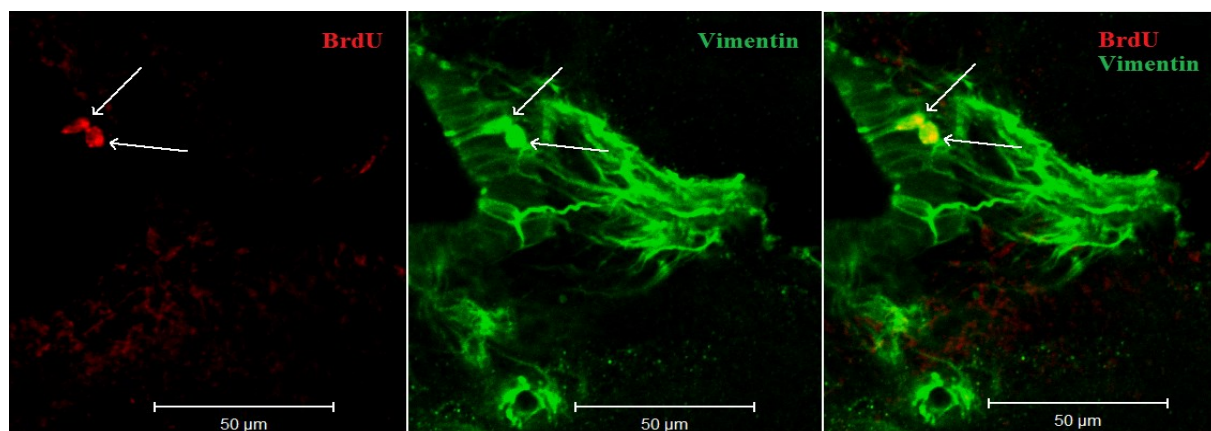
При двойно маркиране със Smo, трансмембранен рецептор на морфогена Sonic hedgehog (Shh), установихме малък брой BrdU+/Smo+ клетки, локализирани в бялото мозъчно вещество на експерименталните животни, евтаназирани на 2-рия час. Потърсихме ко-локализация на BrdU с морфогенния фактор Shh, но не открихме двойно позитивни клетки. Забелязахме и наличие на BrdU-/Shh+ клетки, в предните рога на сивото мозъчно вещество на гръбначния мозък.

### **5. 9. Имунохистохимично изследване на зоната на централния канал на гръбначния мозък.**

Малко е известно за епендимната клетъчна ниша на централния канал на гръбначния мозък. Ето защо насочихме вниманието си именно към тази зона на сивото мозъчно вещество при примати, евтаназирани на различен етап след инфузия с тимидинов маркер (BrdU). Епендимните клетки в SVZ на крайния мозък и в стената на централния канал на гръбначния мозък експресират Vimentin. За да установим дали в тази зона има пролиферация, предприехме двойно маркиране за BrdU и Vimentin. Установихме че 50% от всички BrdU+ клетки в епендимния и в зоната около *canalis centralis*, както в краткосрочната, така и в дългосрочната експериментална група са и Vimentin+ (BrdU+/Vimentin+) (фиг. 5. 24 а, б).



**Фигура 5. 24 а.** Двойно BrdU/Vimentin имунофлуоресцентно оцветяване в зоната около *canalis centralis* на сивото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с BrdU. Със стрелка е посочена BrdU+/Vimentin+ клетка.

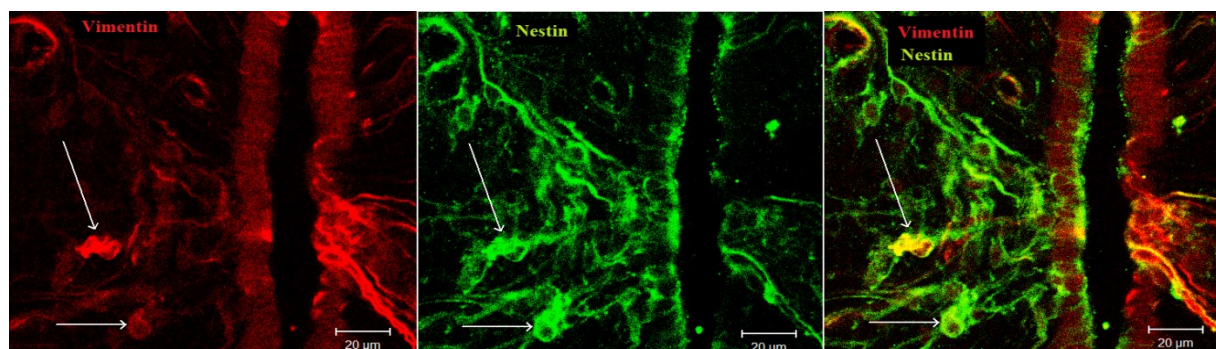


**Фигура 5. 24 б.** Двойно *BrdU/Vimentin* имунофлуоресцентно оцветяване в *canalis centralis* на сивото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 5-та седмица след инфузия с *BrdU*. Със стрелки са посочени *BrdU+/Vimentin+* клетки.

Освен това се вижда ясно как *Vimentin+* клетки образуват дълги израстъци по посока на кръвоносните съдове. Някои от тези израстъци достигат доста големи размери на дължина.

Терминът “мозъчни прекурсори” е еквивалентен на англ. “neural progenitors” и обозначава прекурсорни клетки, които са мултипотентни, т.е. в състояние са да се диференцират както в неврони, така и в глиални клетки (Gage, 2000). В ембрионалното развитие, стволови/прогениторни клетки в мозъка експресират протеините *Musashi 1* (Sakakibara et al, 1996; Kaneko et al, 2000) и *Nestin* (Lendahl et al., 1990; Miyata and Ogawa, 1994). Това прави въпросните протеини кандидати за маркери на прекурсорни клетки и в централната нервна система на възрастните. Ето защо предприехме и двойно маркиране на *Vimentin+* клетки с *Musashi 1* и *Nestin*.

Установихме, че част от клетките на епендимния слой, както и зоната доколо *canalis centralis* в краткосрочната група са позитивни както за *Vimentin*, така и за *Nestin*. *Nestin+* клетки притежават дълги израстъци, които образуват мрежа, насочена назад от задния полюс на централния канал (фиг. 5. 25).



**Фигура 5. 25.** Двойно *Vimentin/Nestin* имунофлуоресцентно оцветяване в зоната около *canalis centralis* на сивото мозъчно вещество на срез от шиен сегмент на възрастна маймуна, евтаназирана на 2-ри час след инфузия с *BrdU*. Със стрелки са посочени *Vimentin+/Nestin+* клетки.

При тройно маркиране за *Vimentin*, *Musashi 1* и *Nestin*, установихме наличието на тройно позитивни клетки, както и на *Nestin+/Vimentin+* израстъци отново в задния полюс на *canalis centralis*.

От направените от нас изследвания установихме по-голяма плътност на клетките в задния полюс на *canalis centralis*. Същата тенденция, но по-слабо изразена, наблюдавахме и в предния полюс на описаната зона. Клетките изглеждат вплетени в израстъци на таницитоподобни клетки, постилащи задния полюс на централния канал.



## 6. Обсъждане

### 6.1. Съсредоточаване на пролиферативните процеси в задните рога на сивото мозъчно вещество и задния сноп на бялото мозъчно вещество в гръбначния мозък на примати.

Настоящото изследване предоставя първите детайлни данни за количеството и фенотипа на пролифериращите клетки в гръбначния мозък на възрастни примати при липса на увреда. Представяме подробен анализ на разпределението на *de novo* образувани клетки в различни зони на интерес и по сегменти в интактен гръбначен мозък на възрастни японски маймуни. За да бележим *de novo* образуваните клетки в централната нервна система на примати, използвахме тъкани, инкорпорирали тимидиновия аналог BrdU, като чрез различни експерименти доказахме избирателността на BrdU като маркер за пролиферация. Животните, бяха евтаназирани на различни предиоди след BrdU. Наличието на BrdU+ клетки в гръбначномозъчната тъкан седмици след приложението на BrdU показва наличието и персистирането на пролиферацията на *de novo* образуваните клетки в интактния гръбначен мозък на експерименталните животни. Следователно, дори и при липса на увреда, пролиферацията в гръбначен мозък на примати продължава при израстнали индивиди. В същото време бе установено редуциране на количествата BrdU+ клетки в групите животни с преживяване от 2, 5 и 10 седмици след BrdU, в сравнение с групата с най-кратка преживяемост след инфузията с тимидиновия аналог. Тези резултати показват, че част от клетките, маркирани скоро след инфузията в последствие загиват или претърпяват поредица деления, в резултат на което BrdU се разрежда до нива, недоловими за използваната от нас имунохистохимична методика.

Нашите резултати като цяло отговарят на предишни изследвания при гризачи (Horner et al., 2000). Аналогични данни на тези при гризачите получихме също и при анализ на броя на *de novo* образуваните клетки, спрямо отдалечеността на изследваната зона от *canalis centralis*. След като измерихме площта на сивото и бялото мозъчно вещество на напречни срези на шийни, гръдни и поясни сегменти от гръбначен мозък на възрастни примати, евтаназирани на 2-ри час, 2-ра, 5-та и 10-та седмица след въвеждането на BrdU установихме, че бялото вещество притежава по-голяма площ от сивото вещество. Изброихме новообразуваните клетки в двете зони на интерес и установихме преобладаването им отново в бялото мозъчно вещество при всички животни, на всички изследвани нива. При изчисляване гъстотата на клетките в зоните на интерес (съотношение брой клетки на 1 mm<sup>2</sup>) установихме, че при краткосрочната експериментална група тя е по-висока в сивото мозъчно вещество на всички изследвани нива. Това се обяснява с

по-големия брой BrdU+ клетки, спрямо по-малката стойност на знаменателя (площта на сивото вещество) при тази експериментална група. При дългосрочната опитна група тази тенденция е по-слабо изразена. Установихме преобладаващ брой BrdU+ клетки в бялото вещество, в сравнение със сивото мозъчно вещество, т. е. в периферната част на гръбначния мозък, ако се няма в предвид площта на разпределение на клетките (т. е. площта на сивото и бялото вещество при примати), също както при гризачи. Тази тенденция се запазва независимо от времето на преживяемост на експерименталните примати, след инфузията с тимидиновия маркер, както и независимо от кое ниво (С, Т, L-сегменти) е взета тъканта. Освен това открихме, че пролиферативните процеси преобладават чисто количествено в задните рога на сивото мозъчно вещество, както и в задния сноп на бялото мозъчно вещество на гръбначния мозък.

## ***6.2. Имунохистохимично сравнение на пролиферативните процеси в сивото и бялото мозъчно вещество между гризачи и примати.***

Тъй като приложението BrdU бе основният метод за проследяване на дялящите се клетки и техните производни в настоящето изследване, ние обърнахме специално внимание на неговата избирателност като пролиферативен маркер. Осъществихме допълнителен експеримент за проверка на избирателността му към пролифериращите клетки. Изследвахме съвместната експресия на BrdU с установен маркер за клетъчна пролиферация-Ki67. Нашите резултати показаха почти пълно припокриване (около 80%) между BrdU и Ki67. Наличието на BrdU+/Ki67- клетки показва, че част от BrdU+ клетки са постмитотични.

В най-голяма фракция от BrdU+ клетки установихме маркери за микроглия. Използвахме Iba1, протеин, който се експресира както в покой, така и при активирана микроглия (Imai and Koshaka, 2002). При краткосрочната експериментална група (2 часа след BrdU) установихме, че 22% от всички BrdU+ клетки са Iba1+. За дългосрочната експериментална група, получихме, че 36% от всички BrdU+ клетки са Iba1+. Аналогични резултати са получени и в гръбначен мозък на интактна Rhesus маймуна (*Macaca mulatta*), като контрола в рамките на изследване върху ефекта на гръбначно-мозъчна травма върху пролиферацията в шиен отдел при примати (Hong et al., 2006).

В рамките на нашата опитна постановка установихме, че втората по честота клетъчна популация е представена от ендотелни клетки. За целта използвахме двойно маркиране с BrdU и ендотелния маркер vWF. За краткосрочната опитна група установихме, че двойнопозитивните клетки са 20%, а при дългосрочната - 30% от всички клетки, експресиращи тимидиновия аналог. Тези резултати са в съответствие на получените за Rhesus маймуни (Hong et al., 2006).

В противовес на настоящите резултати са данни, установени при плъхове (Horner et al., 2000). Като микроглиален маркер авторите използват OX-42, а за ендотелен маркер употребяват RECA. След направени изчисления, те установяват, че BrdU+/OX-2+ клетки и BrdU+/RECA+ клетки, съставляват по-малко от 2% от всички новоформирани клетки в краткосрочната група и намаляват сигнификантно до 4-та седмица. Тези съществени количествени различия с нашите резултати могат да се дължат на специфичните особености на посочените маркери и/или видовите разлики между плъхове и примати.

Като маркер за глиални прогенитори използвахме A2B5 (Blanemore et al., 2004). В двете експериментални групи (краткосрочна и дългосрочна) установихме, че около 5% от всички новообразувани клетки, експресиращи тимидиновия аналог, са A2B5+. Съществени различия са получени при аналогичен експеримент с плъхове (Horner et al., 2000). При по-низшите бозайници, като глиален прогениторен маркер е използван протеогликанът NG2. В това изследване авторите доказват че най-многобройната клетъчна популация е представена от BrdU+/NG2+клетки ( $\approx 70\%$ ), както при краткосрочната (1 ден след инфузията), така и при дългосрочната опитна група (4 седмици след BrdU) на плъховете.

За да установим дали глиалните прогенитори се диференцират в олигодендрцити или астроцити, използвахме маркери за по-късните фази на глиогенезата - O4 за олигодендрцитния ред (Pistollato et al., 2007) и GFAP като специфичен астроцитен маркер (Boyes et al., 1986). Анализът на нашите данни показва, че както при краткосрочната, така и при дългосрочната експериментална група, броят на клетките, експресиращи олигодендрцитния маркер O4 е 5% от всички новообразувани клетки. Сравнено с резултатите, получени при плъхове, по отношение на олигодендрцитния ред също наблюдавахме различия - 4 седмици след BrdU тези клетки при плъхове са под 1%.

При интактен гръбначен мозък на маймуни резултатите са сходни с тези при гризачи. Използвайки двойно маркиране за астроцити и олигодендрцити, авторите доказват, че по-малко от 1% от BrdU+ клетки принадлежат към тези две клетъчни линии (Hong et al., 2006). Ние изчислихме, че при примати BrdU+/GFAP+ клетъчната фракция съставлява по-малко от 1 % от всички BrdU+ клетки 2 часа след инжектирането на BrdU. При опитната ни група с дълга преживяемост 7% от *de novo* образуваните клетки експресираха GFAP. Съобщените резултати при гризачи са аналогични - под 1% от BrdU+ клетки експресират маркери за астроцити (Horner et al., 2000).

Пролиферацията на невронални прекурсори бе изследвана чрез маркера  $\beta$ -tubulin, class III (Lee et al., 1990; Pencea et al., 2001). В допълнение на това, използвахме и невроналния маркер NeuN за да отдиференцираме наличието на новообразувани неврони от зрелите такива. В нашето изследване не установихме

наличието на BrdU+/ $\beta$ -tubulin+ клетки, както и BrdU+/NeuN+ клетки, при всички експериментални групи (краткосрочна и дългосрочна) на всички изследвани нива, въпреки голямата концентрация на *de novo* образувани клетки в пределите на сивото мозъчно вещество. В това отношение нашите резултати са в унисон с тези при гризачи (Horner et al., 2000). Данните са обобщени в **таблица 6. 1**.

BrdU+ клетки	Възрастни маймуни; краткосрочна група (2 часа след BrdU)	Възрастни маймуни; дългосрочна група (2, 5, 10 седмици след BrdU)
Ki 67+	80%	25%
vWF+	20%	30%
Iba 1+	22%	36%
A2B5+	5%	5%
O4+	5%	5%
GFAP+	< 1%	7%
$\beta$ III-tubolin+	0%	0%
NeuN+	0%	0%
Други	47%	17%
Общо	100%	100%

**Таблица 6. 1.** Процентен дял на клетъчните субпопулации в краткосрочната и дългосрочната експериментална група.

### **6.3. Имунохистохимично сравнение на експресията на транскрипционни фактори в гръбначен мозък на гризачи и примати.**

В 47% от *de novo* образуванията при краткосрочната експериментална група и в 17% от BrdU+ клетки при приматите с дълга преживяемост не се причислиха към нито една от споменатите до момента клетъчни популации. Това наложи изследването на допълнителни маркери. Ние избрахме такива транскрипционни фактори, чиято експресия е установена в ембрионален гръбначен мозък. Прогресът в разбирането относно молекулните механизми на ембрионалната неврогенеза през последните години и възможността част от тези механизми да функционират и при прогениторни клетки на централната нервна система при възрастни (Gotz, 2003; Alvarez-Buylla et al., 2004, Tonchev et al., 2006), ни накара да изследваме такива маркери и в гръбначен мозък на маймуни. При гризачи вече бе доказана експресията на различни транскрипционни фактори в прогениторни клетки, например.

В настоящото изследване осъществихме двойно маркиране на BrdU клетки с фактори, свързани с олигодендроцитната пролиферация и диференциация като

транскрипционните фактори Olig1, Olig2, Olig3. Установихме, че BrdU+/Olig1+, както и BrdU+/Olig2+ клетки се срещат само в бялото мозъчно вещество на гръбначния мозък при групата на 2-ри час след апликацията на BrdU. BrdU+/Olig3+ клетки бяха наблюдавани както в сивото, така и в бялото вещество на гръбначния мозък при животните от същата експериментална група. При изследване на експресията на същите транскрипционни фактори при гризачи е доказана експресията на Olig1, само в пределите на сивото мозъчно вещество, а на Olig2 – в двете зони на интерес (Rowitch, 2004). Предходни изследвания доказват, че комбинаторната експресия на тези фактори влияе върху диференцирането на олигодендроцитите. Така например едновременният ефект на Olig 2 и Nkx2.2 води до преждевременното узряване на тези клетки (Zhou et al., 2001), а подтискането им - до подтискане на олигодендроцитната диференциация (Fu et al., 2002). Доказано е, че тези транскрипционни фактори се експресират в глиални прогениторни клетки (идентифицирани чрез маркера NG2) при травматична или химична увреда на гръбначния мозък (Yamamoto et al., 2001, Arnett et al., 2004; Fancy et al., 2004; Watanabe et al., 2004) и имат значение за регулацията на съзряването на олигодендроцити в условията на увреда на ЦНС при възрастни.

Друга причина, поради която изследвахме експресията на Olig2 в интактен гръбначен мозък при примати, са данните за възможността му да насочва диференциацията на прогениторните клетки към мотоневрони. Известно е, че формирането на мотоневрони завършва с изчерпването на невроналните прогенитори и започва фазата на олигодендроцитогенеза, в която ключова роля има Olig2 (Takebayashi et al., 2002). Това обяснява защо липсата на този протеин, води до едновременната загуба на два клетъчни типа: мотоневрони и олигодендроцити (Takebayashi et al., 2002). Допълнително, в литературата открихме данни, че Olig2+ клетки участват в генерирането на астроцити в близост до *pia mater*, както и на епендимни клетки във вентрикулната система на крайния мозък. Можем да обобщим, че клетки, експресиращи Olig2, могат в следствие да дадат началото на всички клетъчни типове в ЦНС (Masahira et al., 2006). За семейство транскрипционни фактори Olig1-3 може да се обобщи, че вземат участие в ключови фази на олигодендроцитогенезата и осигуряват взаимодействието на олигодендроцитните прогенитори с останалите клетъчни субпопулации в ЦНС (Lu et al., 2000, 2002; Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001; Takebayashi et al., 2000, 2002; Zhou and Anderson, 2002; Zhou et al., 2000).

Като следваща стъпка в насоящата ни работа, предприехме двойно маркиране на *de novo* образуваните клетки с транскрипционните фактори Ngn1 и Ngn2. Установихме ко-локализация в бялото мозъчно вещество между BrdU и Ngn1 и липса на ко-локализация на BrdU и Ngn2. За Ngn1 и Ngn2 е известно, че играят ключова роля в регулацията на прогениторите в дорзалната плочка по

време на ембрионалното развитие на гръбначния мозък. Обяснението за липса на BrdU+/Ngn2+ клетки вероятно се крие във факта, че този протеин подпомага невроналната диференциация в ЦНС (Heins et al., 2002; Scardigli et al., 2003), като се експресира в невроналните прогенитори (Lee et al., 1995; Torii et al., 1999). Наличие на експресия на Ngn2 е доказана в ембрионален и адултен гръбначен мозък в *in vitro* условия, но липсват доказателства за експресията му при възрастни *in vivo*, дори след гръбначно-мозъчна травма (Yamamoto et al., 2001). Независимо че в гръбначния мозък е доказано присъствието на прогениторни клетки, както в настоящото, така и в предходни изследвания при гризачи, образуване на неврони не е доказано нито в интактен, нито в увреден гръбначен мозък (Johansson et al., 1999; Namiki and Tator, 1999; Horner et al., 2000). Вероятно неврогенезата в тази част на ЦНС е силно ограничена, поради неблагоприятната за прогениторите обкръжаваща среда в *in vivo* условия (Yamamoto et al., 2001).

Други анализирани от нас транскрипционни фактори бяха Sox1, Sox2, и Emx2. Установихме, че BrdU+/Sox1+ клетки се срещат както в краткосрочната, така и в дългосрочната група опитни животни, както в сивото, така и бялото вещество на гръбначния мозък. BrdU+/Sox2+ клетки се срещат в много малък процент само при експерименталните маймуни, евтаназирани на 2-ри час след апликацията на тимидиновия маркер и то само в бялото мозъчно вещество. BrdU+/Emx2+ клетки се оказаха и най-многобройната субпопулация клетки, експресиращи транскрипционни фактори при приматите с кратка преживяемост след BrdU. Обяснението за това е, че изброените протеини са фактори, подтискащи неврогенезата по време на ембрионалното развитие (Bylund et al., 2003), като по този начин предотвратяват експресията на маркери за диференцирани клетки в BrdU такива. Това се дължи на задържане на стволовите клетки в клетъчен цикъл, а оттам - до блок на фазите на диференциация и миграция (Graham et al., 2003).

#### **6. 4. Имунохистохимично сравнение на пролиферативните процеси в зоната на централния канал на сивото мозъчно вещество в гръбначен мозък на гризачи и примати.**

Насочихме вниманието си специално към зоната на централния канал на сивото мозъчно вещество на гръбначния мозък при примати, евтаназирани на различен етап след инфузия с BrdU. Известно е, че епендимните клетки в SVZ на крайния мозък и в стената на централния канал на гръбначния мозък експресират Vimentin. За да проверим дали в тази част на ЦНС се наблюдава пролиферация, предприехме двойно оцветяване за BrdU и Vimentin и установихме, че близо 50% от клетките на епендимния слой на централния канал и зоната около него са

позитивни за BrdU са и Vimentin+ и в двете експериментални групи (с кратка и дълга преживяемост след BrdU). Подобни резултати са описани при гризачи (Hamilton et al., 2009). Освен това установихме, че част от Vimentin+ клетки образуват дълги израстъци, някои от които достигат до над 100 µm, по посока на кръвоносните съдове. Както при гризачи (Hamilton et al., 2009), така и в насоящото изследване при примати, установихме по-голяма плътност на тези клетки в задния полюс на централния канал. В двата случая *de novo* образуваните клетки са концентрирани предимно в епендимния слой на изследваната зона и се срещат доста по-рядко в паренхима, непосредствено заобикалящ *canalis centralis*. Следователно съществува дорзо-вентрална асиметрия в разпределението на пролифериращите клетки в тази част на ЦНС. Тъй като по време на ембрионалното развитие стволови и прогениторни клетки в мозъка експресират протеините Musashi1 (Sakakibara et al., 1996; Kaneko et al., 2000) и Nestin (Lendahl et al., 1990; Miyata and Ogawa, 1994), предприехме двойни оцветявания с тези маркери. Доказване наличието на Vimentin+/Musashi1+ клетки, както и на Vimentin+/Nestin+ в паренхима на сивото вещество, непосредствено заобикалящ централния канал, е в съзвучие с резултатите, поучени при плъхове (Hamilton et al., 2009). Аналогично и в двата случая тези клетки са локализирани предимно в задния полюс на изследваната зона и образуват дълъг израстък, насочен по срединната равнина дорзално. По-слабо изразена подобна тенденция се наблюдава и вентрално. Следователно, както при възрастни пъхове, така и при полово зрели маймуни, в епендимния и субепендимния слой на централния канал се експресират маркери за невронални прекурсори.

## **7. Изводи**

1. Клетъчна пролиферация съществува в интактен гръбначен мозък на възрастни примати.
2. Гъстотата на новообразуваните клетки в сивото мозъчно вещество е по-голяма в сравнение с бялото вещество.
3. Част от новообразуваните клетки претърпяват клетъчна смърт или няколкократно деления скоро след образуването си.
4. Налице е по-голяма гъстота на новообразуваните клетки в шийните сегменти на гръбначния мозък в сравнение с гръдни и поясни сегменти.
5. Микроглиалните клетки са най-многобройната пролиферираща клетъчна популация в интактен гръбначен мозък на възрастни примати.
6. Част от новообразуваните клетки експресират фенотип на недиференцирани неврални или глиални, но не и невронални прогенитори.
7. Централният канал на гръбначен мозък на примати е прогениторна клетъчна микросреда за тяхното развитие.

## **8. Приноси на дисертационния труд**

1. За първи път се осъществява детайлно изследване и проследяване на клетъчната пролиферация на различни нива в интактен гръбначен мозък на възрастни примати, както и по отношение на сивото и бялото мозъчно вещество.
2. Установеният висок процент пролифериращи микроглиални клетки е специфичен за приматите и представлява оригинален принос на дисертацията.
3. Наличието на елементи на стволово-клетъчна/прогениторна ниша около епедимните клетки на централния канал се установява за първи път при примати.
4. Налице е терапевтичен прозорец през първите 2 седмици след образуване на нови прогенитори в гръбначния мозък – това може да се използва в бъдещи стратегии за лечение на гръбначно-мозъчни заболявания, базирани на ендогенни прогенитори.



## 9. Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **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, 19:141-144.
2. **Маринова Д**, Михалева В, Ангелова М, Павлов С, Ямашима Т, Горанова В, Тончев А. Количество и разпределение на пролифериращи клетки в ювенилен и адултен гръбначен мозък на примати. Варненски Медицински Форум, 2014, 1:5-11.
3. **Маринова Д**, Ангелова М, Михалева В, Павлов С, Горанова В, Ямашима Т, Тончев А. Фенотип на de novo образувани клетки в гръбначен мозък на възрастни маймуни макаки. Варненски Медицински Форум, 2014, 1:12-19.

## 10. Участия в научни форуми:

1. **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., V-ти Морфологични дни и IX-та Национална конференция по антропология, 01-03.06.2012, София.
2. **Marinova D**, Angelova M, Velikov I, Goranova V, Yamashima T, Tonchev AB. Quantity and distribution of proliferating cells in the juvenile and adult primate spinal cord. XXI Национален конгрес на българското анатомично дружество, 31.05-02.06.2013, София.
3. **Marinova D**, Angelova M, Mihaleva V, Pavlov S, Goranova V, Yamashima T, Tonchev AB. Phenotype of de novo generated cells in the spinal cord of adult macaque monkeys. VI-ти Морфологични дни, 06-08.06.2014, София.

## Благодарности

Най-сърдечно благодаря на научните ми ръководители – проф. д-р Антон Б. Тончев и доц. д-р Ваня Г. Стефowska, за безценните им напътствия и съвети в процеса на работа, за професионализма им, за вярата в мен и за предоставените ми възможности за изява.

Благодаря на проф. д-р Тетцумори Ямашима, ръководител на катедрата по Регенеративна неврохирургия в Университета на Каназава, Япония за предоставените тъкани.

Благодаря на д-р Надежда Бонева за съдействието при отглеждането и евтаназията на опитните животни, както и набирането на хистологичния материал в Каназава, Япония.

На моите учители доц. д-р Минко Минков, доц. д-р Благовеста Нанова, д-р Стефания Терзиева и д-р Здравка Харизанова за всеотдайността, с която ме учеха на анатомия, хистология и цитология.

Благодаря на д-р Стоян Павлов за безценните съвети, които получавах винаги в точното време, на д-р Меглена Ангелова за вярата която ми вдъхваше, и на всички останали колеги от катедрата по Анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет – Варна за подкрепата и доверието им.

На съпруга ми Тодор Маринов и дъщеря ми Марина, които често лишавах от внимание, благодаря за вярата, търпението и обичта, които ми помагаша да продължа напред.

Благодаря на родителите на съпруга ми, Павлина и Добри, за това че ме насърчаваха през цялото време и всеотдайно се посветиха на отглеждането на дъщеря ми.

Най-сърдечно благодаря на моите родители, Галя и Марин, за това че винаги са вярвали в мен и са подкрепяли избора ми да се посветя на медицинската наука.