

Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет по медицина
Катедра „Анатомия и клетъчна биология“

Д-р Мартин Николаев Иванов

**Пролиферация и диференциация на прогениторни
клетки в субвентрикуларната зона от крайния
мозък на възрастни примати**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност
„Анатомия, хистология и цитология”
Направление 7.1 Медицина

Научен ръководител:
доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.

Варна, 2023

Дисертационният труд е оформен върху 147 стандартни машинописни страници. Литературният обзор е подкрепен от 5 фигури. Секцията „Материали и методи“ е подкрепена от 8 фигури и 3 таблици. Резултатите са подкрепени от 46 фигури. В дисертационния труд са използвани 179 литературни източника, от които 178 на латиница и 1 на български език.

Официалната защита ще се състои на.....,, от....., аудитория, в комбинация с предварително насрочена онлайн среща.

Външни членове:

Проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н., МУ –София
Доц. Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова, д.б.,
Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора
Доц. д-р Георги Ников Чалдъков, д.м., МУ – Варна

Вътрешни членове:

Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н., МУ – Варна
Проф. Ваня Горанова Стефowska, д.м., МУ – Варна

Резервен външен член:

Доц. д-р Николай Димитров Димитров, д.м. – Медицински факултет,
Тракийски университет – Стара Загора

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Деян Людмилов Дженков, д.м. – Катедра по обща и
клинична патология, съдебна медицина и деонтология, МУ – Варна

СЪДЪРЖАНИЕ

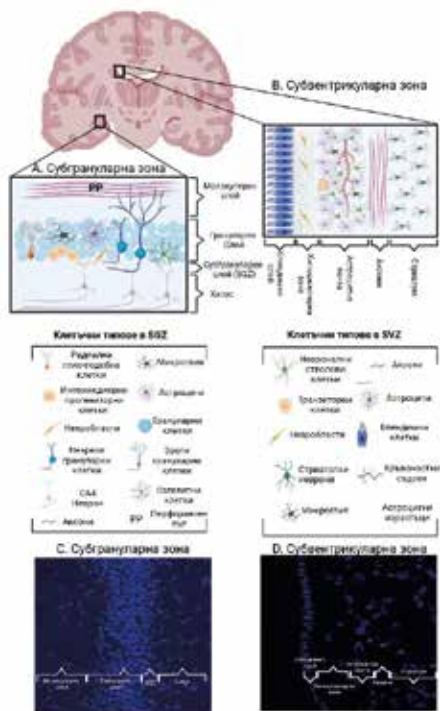
1. Увод	5
2. Материали и методи	7
2.1. Селектиране на гени за фенотипен анализ	7
2.2. Експериментални животни и човешки тъкани	8
2.3. Хирургични процедури	9
2.4. Обработка на тъканите	10
2.5. <i>In situ</i> хибридизационни оцветявания (колориметрични и флуоресцентни)	11
2.5.1. Изолация на РНК	11
2.5.2. Синтез на cDNA	12
2.5.3. Синтез на темплейт	12
2.5.4. Синтез на рибопроби	14
2.5.5. Колориметрично <i>in situ</i> хибридизационно оцветяване	15
2.5.6. Ростро-каудална експресия на избраните гени в нормален маймунски мозък	17
2.5.7. Ростро-каудална пролиферация в нормален маймунски мозък	18
2.5.8. Ростро-каудален анализ на експресия на избраните гени при различни бозайници, използвайки отворени бази данни	18
2.5.9. Флуоресцентно <i>in situ</i> хибридизационно оцветяване	20
2.6. BrdU протокол	24
2.7. Фенотипен анализ на APLNR в нормален човешки мозък	24
2.8. Контролни оцветявания и изследвания	25
2.9. Заснемане на препаратите	28
2.10. Обработка на изображенията	29
2.11. Анализ на изображенията	33
2.12. Обработка на данните и статистика	33
3. Резултати	35
3.1. Анализ на характеристиката на експресия на гените в публичната база данни monkey-niche.org	35
3.2. Анализ на характеристиката на експресия на TNC (Tenascin-C)	35
3.3. Анализ на характеристиката на експресия на APLNR (Apelin receptor)	37

3.4.	Анализ на характеристиката на експресия на GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein)	38
3.5.	Анализ на характеристиката на експресия на CD38 (Cluster of differentiation 38).	40
3.6.	Фенотипен анализ на избраните гени	42
3.7.	Фенотипен анализ на TNC (Tenascin-C).	42
3.8.	Фенотипен анализ на APLNR	43
3.9.	Фенотипен анализ на GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein)	44
3.10.	Фенотипен анализ на CD38.	45
3.11.	Коекспресия между някои от избраните гени	46
3.12.	Фенотип на APLNR позитивни клетки в SVZ от нормален човешки мозък	49
4.	Обсъждане	59
4.1.	Индуциране на експресия на гени след глобална исхемия	59
4.2.	Фенотипна характеристика на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 в нормален маймунски мозък	60
4.2.1.	Фенотипна характеристика на TNC в нормален маймунски мозък.	60
4.2.2.	Фенотипна характеристика на APLNR в нормален маймунски мозък.	61
4.2.3.	Фенотипна характеристика на GJA1 в нормален маймунски мозък.	63
4.2.4.	Фенотипна характеристика на CD38 в нормален маймунски мозък.	63
4.3.	Фенотипна характеристика на APLNR в нормален човешки мозък	64
4.4.	Недостатъци на настоящото проучване	65
5.	Заклучение	67
6.	Изводи	68
7.	Справка за приноса на дисертационния труд	69
8.	Публикации във връзка с докторантурата	69
9.	Използвани съкращения	70
10.	Благодарности	72

1. УВОД

Адултната неврогенеза е процес на генериране на нови неврони от стволови/прогениторни клетки в мозъка на възрастни индивиди. Този процес протича в специфични зони, наречени „ниши“, идентифицирани като субвентрикуларна част на латералния вентрикул и субгрануларната зона на gyrus dentatus на хипокампа (Фиг. 1.1). Демонстрирането на пролифериращи и диференциращи се клетки в тези зони при нисши бозайници (гризачи) е много добре описано и изследвано. Тези изследвания показват потенциала на невралните стволови клетки за ползите на регенеративната медицина. Голямо предизвикателство е да се намерят начини за ефективно увеличаване нивата на неврогенезата и съответно на новообразувани неврони, способни да се интегрират в съществуващи невронални мрежи. Голяма част от интимните процеси, необходими за пълноценна неврогенеза, са проучени при нисши бозайници, най-често гризачи. Съществени различия в цитоархитектурата, клетъчните типове и организация на клетките в тези зони между гризачите и хората затрудняват надеждното транслиране на получените данни и използването им за целите на клинични проучвания. В същото време съдбата на невралните стволови клетки и техните прекурсори при възрастни примати, в т.ч. и хора, е спорна и недобре проучена. В допълнение, наличието на надеждни маркери, използвани за представяне на клетъчни субпопулации, намиращи се в неврогенните зони при гризачи, в голям процент от случаите не са сполучливи и не намират приложение при изследването на неврогенезата при примати. Това налага използването на приматни модели (не-човекоподобни маймуни) за изследване на клетъчната диференциация, пролиферация и интеграция поради факта, че човекоподобните маймуни са филогенетично по-близки до хората. Представеното проучване може да представлява интерес както за учени, занимаващи се с фундаментални изследвания в областта на невронауките и науките за живота, така и за специалисти, ангажирани с транслирането на фундаментални проучвания. В настоящото проучване ние изследваме кандидат гени, повишаващи се след краткотрайна глобална мозъчна исхемия в субвентрикуларната зона на не-човекоподобни маймуни. Състоянието на мозъчна исхемия предизвиква увеличаване на пролиферацията и диференциацията на невралните стволови клетки, което е и добър начин

за скрининг за кандидат гени, участващи в регенеративни и неврогенетични процеси. Тук ние показваме тяхната топографска локализация по протежение на латералния вентрикул (ростро-каудално) и доказваме техния фенотип в нормални условия. Поради възможността за повлияване чрез фармакологично третиране, за APLNR беше направена и подробна имунохистологична фенотипизация в нормален адултен човешки мозък.



Фиг. 1.1: Устройство на основните неврогенни ниши при примати: SGZ и SVZ.

А. Устройство и клетъчен състав на gyrus dentatus, разделен на 3 слоя: молекуларен, грануларен и субгрануларен (SGZ). Схематично са представени главните клетъчни субпопулации, изграждащи тези структури, включително и Тип 1 радиална глия, представляващи невроналните стволови клетки в тази зона. **В.** Устройство и клетъчен състав на субвентрикуларната

зона (SVZ), разделена на 4 слоя: епендимен слой, гап зона, астроцитна панделка и преходна зона, включваща аксони и стриаталния паренхим. Схематично са представени и главните клетъчни субпопулации, изграждащи тези структури, включително и V1 астроцити, представляващи невроналните стволови клетки в тази зона. **C.** Микрография с оцветяване за ядра (DAPI) на gyrus dentatus. Могат да бъдат различени трите слоя на структурата (молекулярен, грануларен, субгрануларен (SGZ)). **D.** Микрография с оцветяване за ядра (DAPI) на SVZ. Могат да бъдат различени четирите слоя на структурата: епендимен слой, гап зона, астроцитна панделка и преходна зона.

Настоящата дисертация представя количествен анализ на пролиферацията и диференциацията на неврални стволови клетки при възрастни примати. Резултатите както от фенотипа на не-човекоподобните примати, така и от хора може да доведат до откриване на по-ефективни начини за активиране на невроналната регенерация и последващото им използване за лечение на невро-дегенеративни или психиатрични заболявания.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Селектиране на гени за фенотипен анализ

За селекцията на гени с повишена експресия в предната субвентрикуларна зона в норма и след исхемично увреждане беше използвана на свободната дигитална база данни *monkey-niche.org*, включваща 150 гена, функционално свързани със стволово-клетъчната биология.

За да вникнем по-дълбоко в клетъчната характеристика на публикуваните там гени, ги прегледахме за наличие на интересна характеристика на експресия и локация. От всички 150 гена избрахме четири, показващи засилена експресия след исхемична увреда, локализиращи и асоцииращи с един или повече компонента на стволово-клетъчна-

та зона (кръвоносни съдове, експресия в епендимния слой или силна експресия в субепендимния слой). Изборът на гените беше направен чрез визуална оценка на генната експресия в зоната на интерес. Генната експресия в три региона при контроли и след исхемично увреждане беше аотирана по следния начин: Силна експресия беше обозначена с „+++“, средна експресия с „++“, ниска с „+“, а липса на експресия с „-“. Така нашият избор се сведе до гените: APLNR (Apelin Receptor), CD38 (Cluster of Differentiation 38), GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein) и TNC (Tenascin-C). Важно е да се отбележи, че маркери като CD133 (Prominin-1), рутинно използвани за откриване на стволови клетки в субвентрикуларната зона при мишка^{18,115}, не се откриват при маймуна (PROM1 (CD133) (monkey-niche.org)). Интересно е също така, че CD133 е фактор, който участва в сигналния път Wnt/beta-catenin и предпазва b-catenin от деградация, а липсата на експресия води до променена пролиферация и склонност към остаряване на клетката (от англ. Senescence)¹¹⁶.

2.2. Експериментални животни и човешки тъкани

За целите на нашето проучване бяха използвани седем броя възрастни японски макаци (*Macaca fuscata*), отнасящи се към семейство Коткоподобни маймуни (Cercopithecidae), първоразряд Тесноноси маймуни (Catarrhini), наречени още „маймуни на Стария свят“ (Old World monkeys): 3 контролни животни (1 мъжка и 2 женски) и 3 исхемични (1 мъжка и 2 женски) на възраст от 5-9 години, което отговаря на полово зрели млади индивиди с тегло към момента на изследването от 7–10 кг. Маймуните са отглеждани в климатизирани клетки със свободен достъп до вода и храна.

Всички процедури, свързани с експерименталните животни, бяха извършени с одобрението на съответните етични комисии (японски маймуни - Етична комисия на Института за експериментални животни на Медицинския факултет на Университета на Каназава, гр. Каназава, Япония).

За удобство мозъчните тъкани от животни без исхемия ще се наричат в текста „контролни“, а мозъчните тъкани от животните, подложени на глобална исхемия, ще бъдат наричани „исхемични“.

За оптимизация на *in situ* хибридизационния протокол бяха използвани маймунски мозъчни тъкани от макаци, предоставени от Немския приматен център (Deutsches Primatenzentrum), гр. Гьотинген, Германия. Всички животни са потомство на маймуни, развъждани в центъра. За удобство в текста те ще бъдат наричани „калибрационни“.

Използваните човешки материали бяха предоставени от Клиниката по обща и клинична патология, УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна с разрешение на етичната комисия (КЕНИ) към Медицински университет – Варна с протокол №86.

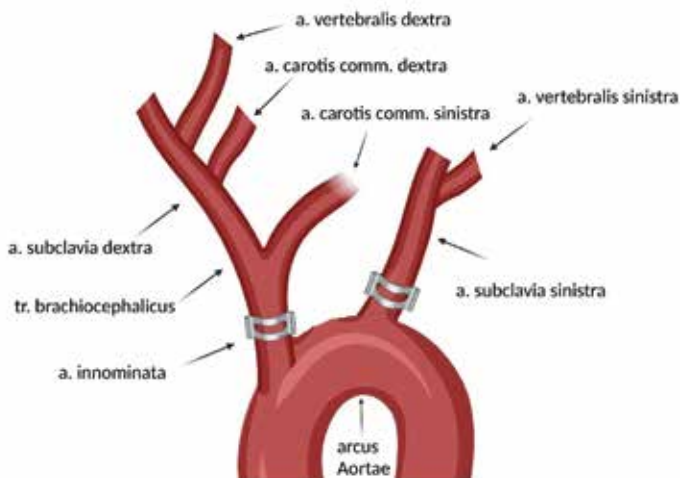
Всички мозъчни материали са събрани по време на рутинна аутопсия, проведена в *post-mortem* интервал, по-кратък от 24 часа, на пациенти без следи от патологични мозъчни изменения и липса на невро-психиатрична анамнеза.

2.3. Хирургични процедури

Всички хирургични процедури, свързани с експерименталните животни, бяха извършени от групата на д-р Т. Ямашима в научното звено на Катедрата по неврохирургия, гр. Каназава, Япония. За индуциране на глобална исхемия всяка маймуна бе анестезирана (кетамин в доза 2-5 мг/кг, *i.m.*), интубирана и свързана към апарат за вентилация. По време на хирургичните процедури маймуните бяха допълнително инхалаторно анестезирани (1% халотан, газова смес 40% O₂/60% N₂O). Бяха проследявани артериално кръвно налягане, пулс, диаметър и реакция на зениците. По време на операцията телесната температура на животните беше поддържана в рамките на 37±0.5°C.

Хирургичната процедура, свързана с глобалната исхемия, беше извършена в стерилни хирургични условия в следната последователност: предна срединна торакотомия, отпрепарирание на кожа и подкожие, прерязване на стернума, отпрепарирание на меките тъкани и визуализация на *a. subclavia sinistra* и *truncus brachiocephalicus* (Фиг. 2.1.).

Последните бяха клампирани с метални клипове за 20 минути в зоната им на излизане от аортата. След това клиповете бяха премахнати и кръвотокът беше възстановен, гръдната клетка беше затворена и животните бяха върнати в клетките им.



Фиг. 2.1: Експериментална процедура за индуциране на глобална исхемия при маймуни: със сиво са представени клампите и тяхната позиция върху артериалните кръвоносни съдове (a. subclavia sinistra и truncus brachiocephalicus/a. innominata). С модификации по ¹¹⁷

3 експериментални животни от контролната група бяха подложени на същите процедури с изключение на клампирането на a. subclavia sinistra и truncus brachiocephalicus.

Животните бяха евтаназирани 7 дни след оперативната процедура. Мозъкът беше екстрахиран от краниума, бързо замразен в течен азот и съхранен във фризер, поддържащ -80°C .

2.4. Обработка на тъканите

Мозъците бяха екстрахираны от черепната кухина и директно замразени в течен азот. Тъканите от експерименталните животни бяха съхранявани на температура от -80°C . За целите на FISH и ИНС при част от тъканите, съдържащи aSVZ и n. caudatus, бяха дисецирани блокчета с размери 2 x 2 см и впоследствие поставени на -80°C в О.С.Т. (Tissue-Tek О.С.Т. (Optimal Cutting Temperature) Compound, Sakura, USA) за едно денонощие. Замразените препарати бяха нарязани на криостатен

микротом (Leica CM3050S) на тъканни срези с дебелина 25 μm , които впоследствие бяха фиксирани, ацетилирани и дехидратирани, както следва: фиксация на препаратите с 4% разтвор на параформалдеhid за 25 минути, последвана от изплакване с 0.9% NaCl два пъти за 2 минути. Ацетилирането беше извършено с 400 ml разтвор на Трис буфер, оцетна киселина и ЕДТА (ТЕА буфер). Разтворът беше разбъркван постоянно с магнитна бъркалка. Към него беше добавен 1 ml ацетанхидрид. Препаратите бяха инкубирани в разтвора 2 пъти по 5 минути със смяна на разтвора. След това препаратите бяха измити в PBS за 2 минути и в 0.9% NaCl за 2 минути. Последва дехидратация във възходяща алкохолна редица 30%, 50%, 70%, 80%, 95% и 2x100% (2 минути за всеки разтвор). Препаратите бяха изсушени за 3 минути на 30°C. След тази процедура стъклата с препаратите бяха затворени в кутии за дългосрочно съхранение на -80°C.

2.5. In situ хибридизационни оцветявания (колориметрични и флуоресцентни)

2.5.1. Изолация на РНК

Тъканни парчета от субвентрикуларната зона (1 cm^3) бяха дисецирани от дясната хемисфера на поне 3 животни. Отдисецираните блокчета бяха претеглени на електронна везна и разделени на партиди от 50 mg в микроцентрофужни епруветки.

Тоталната РНК беше изолирана с RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). За всяка изолация на тотална РНК беше използвана тъкан с тегло 50 mg. Преди процедурата в разтворите от кита бяха добавени следните реагенти: към RLT буфер беше добавен 10 μl бета-меркаптоетанол (за предотвратяване на деградацията на РНК), а към RPE буфер беше добавено необходимото количество 100% етанол.

Към микроепруветка с 50 mg тъканни парчета беше добавен 600 μl RLT буфер и тъканта беше хомогенизирана с помощта на тъканен хомогенизатор (Kinematica Polytron PTMR2100). Тъканният лизат беше центрофугиран за 3 минути на 14 000 rpm и беше отделена супернатанта. Към супернатантата беше добавен 70% етанол и разтворът беше прехвърлен в спин-колонка със силикатно покритие, поставена в съ-

бирателна микроцентрифужна епруветка. Колонката беше промита с буфер RW1, а впоследствие и с буфер RPE. Пречистеното РНК, останало по силикатната мембрана в колонката, беше елуирано с 50 µl ултрачиста вода и последващо центрофугиране. Количеството и чистотата на изолираната тотална РНК бяха потвърдени със спектрофотометър (NanoDrop 2000/20000c, Thermo Scientific).

2.5.2. Синтез на cDNA

Complementary DNA (cDNA) беше синтезирана от изолираната тотална РНК с помощта на обратна транскриптаза (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Thermo Fisher Scientific). Накратко, 2 µg тотална РНК беше смесена с oligo(dT)₂₀, dNTPs и DEPC-третирана вода до 10 µL. Сместа беше инкубирана на 65°C за 5 минути. Към този разтвор бяха добавени съответните количества 10X RT буфер, 5 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, RNaseOUT™ (40 U/µL) и ензимът обратна транскриптаза SuperScript III RT (200 U/µL). Полученият разтвор беше инкубиран в продължение на 50 минути на 50°C с последващо загряване до 85°C за 5 минути за прекратяване на реакцията. За разграждане на остатъчната РНК в разтвора беше добавено необходимото количество RNase H с последващо инкубиране за 20 минути на 37°C. cDNA, която не беше използвана в последващите реакции, беше замразена на -80°C^{43,118–120}.

2.5.3. Синтез на темплейт

Специфични праймери (forward и reverse) бяха проектирани с помощта на софтуерната програма Primer3¹²¹. Изградените праймери бяха с големина от 20 нуклеотидни бази и приблизително съдържание на CG от 55% (Таблица 1). Теоретичната дължина на ампликона беше с големина над 600 kb с цел по-доброто захващане на пробата за тъканта. Към изградените праймери бяха добавени секвенции за T7 и SP6 (T7: GCGTAATACGACTCACTATAGGG, Sp6: GCGATTTAGGTGACACTATAG), необходими за последващия синтез на рибопроба. За определяне на оптималната температура за свързване на праймерите към cDNA беше използван температурно-градиентен протокол за PCR с различни температури от 49°C до 62°C. Бяха използ-

вани четири аликовти на различни температури, всяка от които съдържаше 10x полимеразен буфер, 2 mM dNTPs (10mM dNTPs, Roche), Таq полимераза (5 U/μl, Qiagen), cDNA 5 μl, 10 pmol от forward и reverse праймерите (100 pmol, MWG Biotech) и вода Milli-Q. Параметрите на PCR машината (Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler Thermal Cycler) бяха следните: 2 минути първоначална денатурация на 94°C, последвани от 35 амплификационни цикъла от 25 секунди денатурация (94°C), 25 секунди свързване (49° до 62°C), 1 минута и 15 секунди удължаване (72°C) и финално удължаване за 9 минути на 72°C. Полученият ампликон беше анализиран на 1% агарозен гел за определяне на оптимална температура на свързване на праймерите към cDNA.

Таблица 1: Списък на изследваните гени, техния идентификационен номер (NCBI), използваните праймери (forward и reverse) и големината на ампликона.

N.B. Показаните праймери са без добавени секвенции за T7 и SP6.

Ген	Идентификационен номер (Mascamulatta)	Forward праймер	Reverse праймер	Големината на ампликона
GFAP	XM_015119892.1	GCTCCAGGATGA AACCAACC	TAATGACCTCTCCA TCCCCG	803
VIM	NM_001284705.1	AATGACCGCTTCG CCAACТА	ACGAAGGTGACGA GCCATTT	813
APLNR	NM_001047126.1	TGATTTTGACAAC TACTATGGGGCA	ATCGAAGAAGGCA TAGAGGAAAGG	925
CD38	NM_001261773.1	GACCCACCTGG AGCCCTAT	CCATGTATCACCCA GGCCTC	755
TNC	XM_011750403.1	CAGAGGAAGGA GCTCGCTA	GACACCAGGTTCT CCAGCTC	757
GJA1	XM_015137308.1	AGCCTACTCAACT GCTGGAG	TCGCCAGTAACCA GCTTGTA	831
Prominin-1 (CD133)	EF193352.1	ATGGCCCTTGTA CTTGGCTC	TCCAACGCCTCTTT GGTCTC	812
CALB1	NM_004929.2	GACGGAAGTGGT TACCTGGA	GGTGTACTGACGG GCCTAAG	924

Последващ втори PCR беше направен при вече установената оптимална температура на свързване на праймерите, но в по-голям обем. След приключване на процедурата малка част от ампликона беше анализирана на 1% агарозен гел. След пречистване на ампликона с помощта на ДНК пречистващ кит (PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) малко количество от ДНК беше анализирано със спектрофотометър и малка част беше изпратена за секвениране. Процедурата по генериране на праймери, температурно-градиентния PCR, финалния PCR и пречистване бяха повторени за всички гени. Продуктите от финалните PCR реакции бяха потвърдени чрез секвениране^{43,118–120}.

2.5.4. Синтез на рибопроби

Рибопробите бяха синтезирани чрез *in vitro* транскрипция. Смес от 1.5 µg от вече синтезирания ДНК темплейт заедно с 2.5 µl 10x РНК транскрипционен буфер (New England Biolabs), 2.5 µl 10x DIG (Digoxigenin) или 2.5 µl 10x Fluorescein микс за бележене на РНК (Roche), 1.5 µl Sp6 РНК полимераза (20,000 U/ml, New England Biolabs), 1 µl от РНКаза инхибитор (40 U/µl, Thermo Scientific) и DEPC-третирана вода (Invitrogen) до общ обем от 30 µl беше инкубирана за 3 часа на 37°C. За двойните флуоресцентни *in situ* хибридационни оцветявания беше използвана една проба, белязана с Digoxigenin (DIG), и една проба, белязана с Fluorescein. Изполваните дигоксигенин или флуоресцеин са конюгирани с уридин – гликолизиран пиримидинов аналог, прикрепен за рибоза. Така при *in vitro* транскрипцията всеки уридин ще бъде свързан с дигоксигенин или флуоресцеин. Последва третиране с 1 µl от ДНаз I (Roche), необходимо за отстраняване на остатъчни следи от ДНК. За извършване на РНК преципитация към получения разтвор бяха прибавяни 108 µl 4 М амониев ацетат и 705 µl 100% етанол, предварително изстудени на –20°C. Разтворът беше инкубиран на –80°C за едно денонощие. На следващия ден пробите бяха центрофугирани на 14 000 rpm за 1 час на 4°C. Получената супернатанта беше отстранена, а РНК преципитатът беше промит с 70% етанол, изсушен за 2–3 минути и елуиран в 30 µl DEPC-третирана вода (Invitrogen). Получената рибопроба беше количествено проверена на спектрофотометър. Към останалото количество рибопроба беше добавен хибридационен буфер (Ambion) до фи-

нална концентрация на пробата от 100 ng/μl. Пробите бяха съхранявани на -20°C до използването им за хибридизация на препаратите^{43,118-120}.

2.5.5. Колориметрично in situ хибридизационно оцветяване

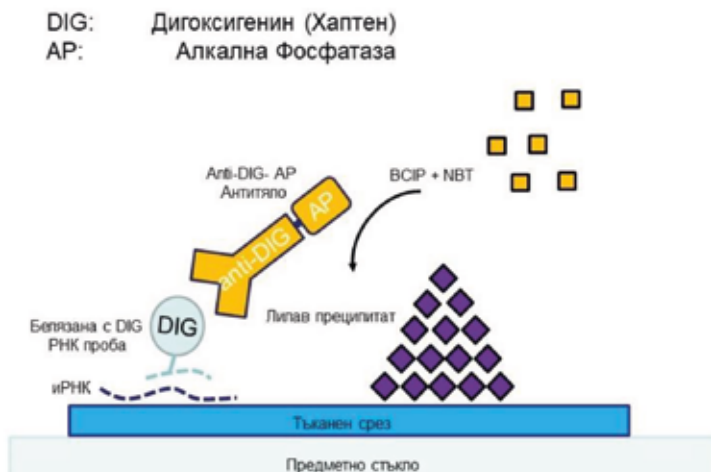
За установяване оптималната концентрация на рибопробата беше извършено предварително оцветяване на коронарен срез от калибрационен маймунски мозък на нивото на латералния вентрикул. За тази цел бяха използвани две концентрации от всяка рибопроба (500 ng и 1000 ng). Получените препарати бяха анализирани за силата на експресия на дадения ген и беше избрана една от двете концентрации за оцветяване на контролните и исхемичните срези на маймунски мозъци.

За колометричното ISH оцветяване беше използван следният протокол:

Всички използвани разтвори бяха приготвени с DEPC-третирана вода, а всички стъпки бяха направени на стайна температура, ако по-надолу в текста не е спомената определена температура. Препаратите бяха предварително извадени от фризер на -80°C и оставени да се темперират на стайна температура за 20 минути. Съответните срези бяха рехидратирани за 5 минути с PBS (Phosphate-buffered saline, буфериран фосфатен буфер), денатурирани с 0.2 N HCl за 10 минути за по-добро проникване на пробата и измити отново с разтвор на PBS (Фиг. 2.2.). За денатуриране на свързаните с mRNA протеини срезите бяха инкубирани два последователни пъти с протеиназа K (35-40 μl/100 ml), разтворена в активиращ Proteinase K (PK) буфер (1 M Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0) и H₂O). Беше извършено двукратно промиване на препаратите по 5 минути с PBS. Срезите бяха фиксирани с 4% разтвор на PFA в PBS за 15 минути и отново промити 2 пъти по 5 минути в PBS. Беше извършена пре-хибридизация за 30 минути на 60°C с хибридизационен (Hyb) буфер, като към него беше добавен непосредствено 1 mg/ml диетил-третол (DTT, Thermo Fisher Scientific). Беше подготвена определената от тестовото оцветяване концентрация на пробата в разтвор, съдържащ tRNA (подпомага свързването на рибопробата към съответната иРНК) и Hyb буфер с обем 100 μl. Инкубацията продължи едно денонощие на 60°C. На следващия ден препаратите бяха промити с разтвори на натриев цитрат с различна концентрация на 60°C за измиване на несвързаната с иРНК проба. Последва промиване с PBST (Phosphate-buffered saline

с добавен 0.1% Tween-20) и блокиране с 10% инактивиран овчи серум, разтворен в PBST. Последната стъпка е необходима за предотвратяване неспецифичното свързване на антигените поради използването в следващата стъпка на антитяло, произведено в овца, което разпознава дигоксигенин, инкорпориран при *in vitro* транскрипцията на РНК. Антитялото anti-Digoxigenin-AP (Alkaline Phosphatase) беше разрежено заедно с 10% инактивиран овчи серум в PBST и инкубирано на стайна температура за 1 час и 30 минути. Последва стъпка с измиване в PBST 2 пъти по 20 минути. След това препаратите бяха третираны с TMN буфер с добавен непосредствено към него левамизол, използван като инхибитор на ендогенната алкална фосфатаза (5mM Levamisole; pH 9.5). Оцветяването на препаратите се извърши с разтвор на NBT (nitro-blue tetrazolium chloride, Roche) и BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt, Roche), разтворени в TMN буфер. Препаратите бяха наблюдавани на светлинен микроскоп през 30 минути до появяване на специфичното виолетово оцветяване. Реакцията беше спряна чрез промиването им в PBS 3 пъти по 10 минути. Препаратите бяха покрити със среда Hydro-Mount и оставени да изсъхнат на 37°C за едно денонощие^{43,118-120}.

Не-радиоактивна колориметрична ин-ситу хибридикация



Фиг. 2.2: Схематично представяне на колориметрично *in situ* хибридикационно оцветяване. Представено с модификации по „*In Situ Hybridization Methods*. Vol. 99“ (Springer New York, 2015)¹²⁰.

Всички препарати бяха дигитално заснети с резолюция 0.501 μm /pixel на автоматичен дигитален скенер за препарати Aperio ScanScope AT2 (Leica Biosystems, Germany).

2.5.6. Ростро-каудална експресия на избраните гени в нормален маймунски мозък

За да разберем дали има разлика в ростро-каудалната експресия на избраните от нас гени, използвахме три коронарни нива, отговарящи съответно на най-ростралната част на вентрикула (+30)¹²², средата (+23)¹²² и най-каудалната част (+15)¹²² на вентрикула. Координатите +30, +23 и +15 представляват 30 мм, 23 мм и 15 мм от интрааурикуларната линия. Избраните срези бяха оцветени чрез колориметрична *in situ* хибридизация за съответните гени. За да проучим точното количествено увеличение на тези гени след исхемия, използвахме данните от транскриптомния анализ⁴³ и софтуерно измерени данни, показващи силата на експресия на тези гени. Околичествяването се осъществи чрез полуавтоматично преброяване на позитивните клетки чрез софтуера CellDetekt (version 2.7; <https://github.com/tumrod/cellDetekt>¹²³).

Експресията на всеки един от тях беше измерена в епендимния слой (Ependymal layer, EL) и субепендимния слой (Subependymal layer, SEL) по цялата дължина на вентрикула и в случайно избран регион в стриатума (200 x 200 μm) посредством софтуера CellDetekt¹²³. Самият софтуер намира локализацията на клетките и степента на експресия на дадения ген, като ги категоризира в следните категории: (1.) В червено: клетки с много силна експресия на дадения ген; (2.) В синьо: клетки със силна експресия; (3.) В жълто: клетки със слаба експресия; (4.) В сиво: клетки без експресия; (5.) В черно: фон без клетки. Беше изчислено съотношението между категория 1 и 2 към всички клетки при двете състояния и съответноторатно увеличение на генната експресия при контрола спрямо исхемия. В допълнение беше направена и статистика на релативната експресия на посочените гени, определена с данните от транскриптомния анализ (RNA-seq, RNA sequencing), посочени като брой генни копия, нормализирани към тоталния брой на генните копия от три контролни и три исхемични маймуни⁴³.

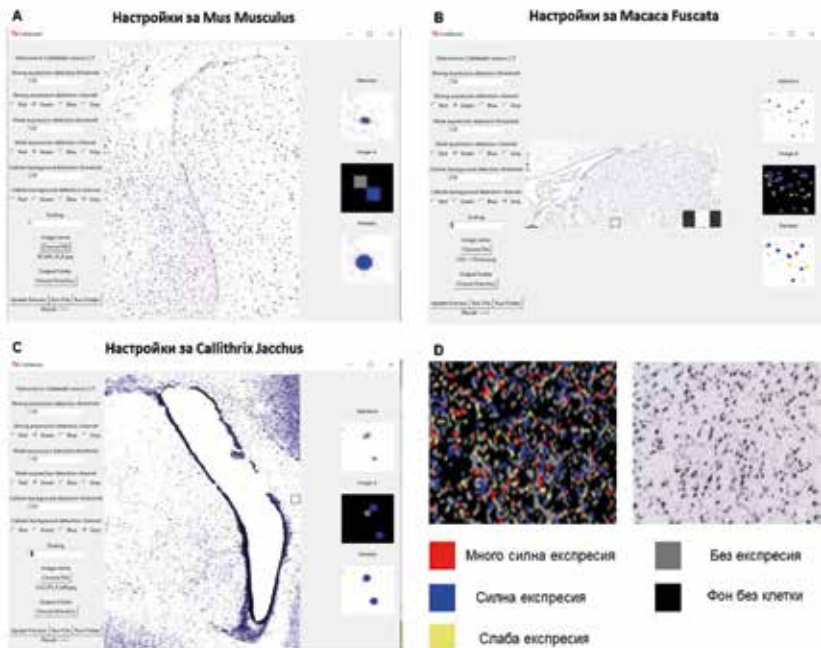
2.5.7. Ростро-каудална пролиферация в нормален миймунски мозък

За да разберем количеството на дялящите се клетки по ростро-каудалната ос на вентрикула, използвахме имунохистохимично оцветяване за пролиферативния маркер Ki67. Накратко, препаратите бяха подложени на антигенно възстановяване (DAKO PT Link, Germany) в цитратен буфер (pH 6) на 97°C за 5 минути с последващо охлаждане на лед за 30 минути. Препаратите бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и блокирани за 1 час с 10% (Cat. No S-1000, Vectorlabs) нормален кози серум, разтворен в PBS с 0.1% Tween-20. Първичните антители бяха инкубирани в комбинация с блокиращ разтвор за едно денонощие на 4°C. На следващия ден стъклата бяха промити в PBS 3 пъти по 5 минути и инкубирани за 2 часа на стайна температура с вторични антители, конюгирани с AlexaFluor-555 (Thermo Fisher Scientific, Germany). След това стъклата бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и бяха покрити с покривна среда (ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, USA)⁴³. Препаратите бяха заснети с помощта на епифлуоресцентен микроскоп Zeiss AxioImager Z.2 (Carl Zeiss GmbH), снабден с напълно моторизирана предметна масичка и монохромна CCD камера AxioCam Mrm rev.3 (Carl Zeiss GmbH). Поради малкия брой позитивни клетки (<50) клетките бяха ръчно преброени на всяко стъкло по цялата дорзо-вентрална част на вентрикула. За прегледност на визуализацията всяка позитивна клетка беше отбелязана като червена точка върху изображението на съответното ниво. Използваните изображения бяха взети от „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²².

2.5.8. Ростро-каудален анализ на експресия на избраните гени при различни бозайници, използвайки отворени бази данни

За осъществяване на ростро-каудалния анализ бяха използвани отворени бази данни, съдържащи информация за генната експресия на TNC, APLNR, CD38 и GJA1 на три коронарни нива, отговарящи съответно на най-ростралната част на вентрикула (+30)¹²², средата (+23)¹²² и най-каудалната част (+15)¹²² при *Mus musculus*, *Callithrix jacchus* и *Macaca fasciata*. За ориентир бяха използвани различни анатомични

маркери (например мястото на отваряне на трети вентрикул). Околичествихме експресията на гените чрез полуавтоматично преброяване на позитивните клетки чрез софтуера CellDetekt по цялата дължина на вентрикула при трите вида. Експресията на всеки един от тях беше измерена в субependимния слой (Subependymal layer, SEL) по цялата дължина на вентрикула и в случайно избран регион в стриатума (200 x 200 μm) посредством софтуера CellDetekt. Бяха използвани различни настройки за обработване при трите вида бозайници (Фиг. 2.3). Самият софтуер намира локализацията на клетките и определя степента на експресия на дадения ген, като ги категоризира в следните категории: (1.) В червено: клетки с много силна експресия на дадения ген; (2.) В синьо: клетки със силна експресия; (3.) В жълто: клетки със слаба експресия; (4.) В сиво: клетки без експресия; (5.) В черно: фон без клетки.



Фиг. 2.3: Настройки, използвани в CellDetekt за *Mus musculus* (A), *Callithrix jacchus* (C) и *Macaca fuscata* (B). Примерно изображение за резултат, получен след използване на CellDetekt, и цветно категоризиране степента на експресия (D).

Данните за *Callithrix jacchus* бяха взети от ISH атлас на Institute of Physical and Chemical Research (Riken), Япония ([Marmoset Gene Atlas \(brainminds.jp\)](http://Marmoset Gene Atlas (brainminds.jp))). Данните за *Mus musculus* бяха взети от ISH атлас на Allen Institute for Brain Science, USA (дата на изтегляне на файловете: 20.03.2022). Препаратите от *Macaca fuscata* бяха направени от нас чрез мануална колориметрична *in situ* хибридизация (Виж 5.5.5. Колориметрично *in situ* хибридизационно оцветяване).

2.5.9. Флуоресцентно *in situ* хибридизационно оцветяване

За флуоресцентното ISH оцветяване беше използван следният протокол:

Всички използвани разтвори бяха приготвени от DEPC-третирана вода, а всички стъпки бяха направени на стайна температура, освен когато се споменава по-надолу в текста определена температура. Препаратите бяха предварително извадени от фризер на -80°C и оставени 20 минути да се темперират на стайна температура (Фиг. 2.4). Ендогенната пероксидаза на съответните срези беше блокирана с 3% H_2O_2 в метанол, приготвен непосредствено преди инкубацията. Срезите бяха промити за 2 пъти по 5 минути с PBS (Phosphate-buffered saline, буфериран фосфатен буфер), денатурирани с 0.2 N HCl за 10 минути за по-добро проникване на пробата и измити отново с разтвор на PBS. За денатуриране на свързаните с mRNA протеини срезите бяха инкубирани два последователни пъти с протеиназа K (35-40 $\mu\text{l}/100\text{ml}$), разтворена в активиращ РК буфер (1 M Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0) и H_2O). Беше извършено промиване на препаратите 2 пъти по 5 минути с PBS. Срезите бяха фиксирани с разтвор на 4% PFA в PBS за 15 минути и отново промити 2 пъти по 5 минути в PBS. Беше извършена прехибридизация за 30 минути на 60°C с Hyb буфер, като към него беше добавен непосредствено 1 mg/ml диетилтритол (DTT, Thermo Fisher Scientific). Беше подготвена определената от тестовото оцветяване концентрация на пробата, белязана с дигоксигенин (за единично флуоресцентен FISH), в разтвор, съдържащ tRNA (подпомага свързването на рибопробата към съответната иРНК) и Hyb буфер с обем 100 μl . Инкубацията продължава едно денонощие при 60°C . В случаите на двойни FISH оцветявания

една от пробите беше белязана с дигоксигенин, а другата с флуоресцеин в съответните работни концентрации.

На следващия ден препаратите бяха промити с разтвори на натриев цитрат с различна концентрация на 60°C с цел измиване на несвързаната с иРНК проба. Последва промиване с PBST (Phosphate-buffered saline с добавен 0.1% Tween-20) и блокиране с 10% инактивиран овчи серум, разтворен в TNB (Tris-HCl (pH 7.5), NaCl и 0.5% блокиращ реагент (PerkinElmer, FP1020)). Последната стъпка е необходима за предотвратяване неспецифичното свързване на антигените поради използването в следващата стъпка на антияло, произведено в овца, което разпознава дигоксигенина, инкорпориран при *in vitro* транскрипцията на РНК. Антиялото анти-дигоксигенин (пероксидаза) беше разрежено заедно с 10% инактивиран овчи серум в TNB и инкубирано на стайна температура за 30 минути. В случаите с двойни FISH оцветявания беше използвано и антияло анти-флуоресцеин (пероксидаза).

Препаратите бяха измити с TNT (Tris-NaCl-Tween буфер) 3 пъти по 5 минути. Флуоресцентното оцветяване беше направено с тирамиден работен разтвор, съдържащ флуорофлорен тирамиден разтвор (Cy3), разрежен в 1x амплификационен буфер. Инкубацията с последния разтвор продължи 3 минути. Целта на последните стъпки е да се превърне неактивният тирамид в активен благодарение на присъствието на пероксидаза върху антиялото, водеща до депозицията му около иРНК на интерес^{124,125}. Препаратите бяха промити 3 пъти по 5 минути в TNT за прекратяване на реакцията.

За осъществяване на двойни FISH оцветявания препаратите бяха промити в 0.2 M HCl за 15 минути и 3 пъти по 15 минути в TNT буфер. Третирането с HCl цели премахването на анти-дигоксигенин пероксидаза. Бяха блокирани с овчи серум в TNB за 15 минути. Беше апликирано антияло анти-флуоресцеин пероксидаза за 30 минути, което беше непосредствено последвано от промиване за 15 минути с TNT буфер. За визуализация на реакцията беше използван тирамиден работен разтвор, съдържащ флуорофлорен тирамиден разтвор (FITC), разрежен в 1x амплификационен буфер за 7–10 минути. Реакцията беше прекратена с промиване с TNT буфер за 15 минути^{43,118–120}.

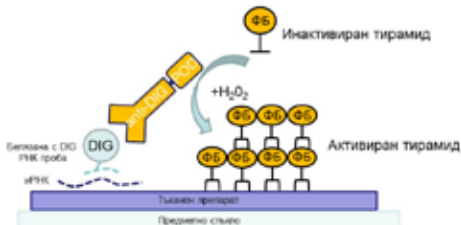
Всички флуоресцентни препарати бяха оцветени с ядрения маркер DAPI за 5 минути.

Не-радиоактивна флуоресцентна ин-ситу хибридизация

DIG: Дигоксигененин (Хаптен)

POD: Пероксидаза

ФБ: Флуоресцентна боя



Фиг. 2.4: Схематично представяне на флуоресцентно *in situ* хибридизационно оцветяване (Fluorescent In situ hybridization, FISH). Представено с модификации по „In Situ Hybridization Methods. Vol. 99“ (Springer New York, 2015)¹²⁰.

Единичните или двойните FISH оцветявания бяха допълнително комбинирани с различни антители, представени в Таблица 2.

След единичното или двойното FISH оцветяване препаратите бяха подложени на антигенно възстановяване (DAKO PT Link, Germany) в цитратен буфер (pH 6) на 97°C за 5 минути с последващо охлаждане на лед за 30 минути. Препаратите бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и блокирани за 1 час с 10% (Cat. No S-1000, Vectorlabs) нормален кози серум, разтворен в PBS с 0.1% Tween-20. Първичните антители бяха инкубирани в комбинация с блокиращ разтвор за едно денонощие на 4°C. На следващия ден стъклата бяха промити в PBS 3 пъти по 5 минути и инкубирани за 2 часа на стайна температура с вторични антители, конюгирани с AlexaFluor-488 или AlexaFluor-647 (Thermo Fisher Scientific, Germany). След това стъклата бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и бяха покрити с покривна среда (ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, USA)⁴³.

Таблица 2: Списък на използваните първични антитела, техния тип и приложение за целите на настоящото изследване

Антитяло	Вид, изотип	Разреждане	Компания, каталожен номер
анти-BrdU	плъх	1:100	Cat. No Ab6326, Abcam, Cambridge, United Kingdom
анти-GFAP	мишка	1:400	Cat. No M0761, Dako-Agilent Technologies GmbH, Hamburg, Germany
анти-GFAP	кокошка	1:1000	Cat. No AB5541, Merck Millipore
Анти-GLUT1/SLC2A1	заек	1:100	Cat. No HPA031345, Sigma-Aldrich
анти-Vimentin	мишка	1:1000	Cat. No MAB3400, Merck Millipore
анти-Apelin receptor (APLNR)	мишка	1:100	Cat. No MAB856, R&D Systems
анти-DCX	коза	1:50	Cat. No sc-8066, Santa Cruz
анти-S100b	заек	1:200	Cat. No Z0311, DAKO
Анти-GFAP-delta	заек	1:1000	Cat. No AB9598, Sigma-Aldrich
Анти-Ki67	плъх	1:50	Clone TEC-3, DAKO

Таблица 3: Списък на вторични антитела, техния тип, приложени за целта на настоящото проучване. Използвани съкращения: Rb, rabbit; Mo, mouse; Gt, goat; Gpig, guinea pig; Chk, chicken

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Rb 488	Thermo Fisher Scientific	A11008	1:300
Rb 555	Thermo Fisher Scientific	A27039	1:300
Rb 647	Thermo Fisher Scientific	A27040	1:300
Mo 647	Thermo Fisher Scientific	A-21235	1:300
Gt 488	Thermo Fisher Scientific	A-11078	1:300
Gt 596	Thermo Fisher Scientific	A-11055	1:300
Chk 555	Thermo Fisher Scientific	A-21437	1:300
Rat 594	Thermo Fisher Scientific	A-11007	1:300
Gt 555	Thermo Fisher Scientific	A-21432	1:300

2.6. BrdU протокол

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) беше разтворен в 0.9% NaCl. Едно експериментално животно беше инжектирано с доза 100 mg/kg i.v. в продължение на 5 дни (общо количество BrdU за маймуната е 500 mg/kg). Маймуната беше евтаназизирана 2 часа след последната инжекция с BrdU. BrdU може да се инкорпорира и в апоптични клетки, но предишни изследвания^{71,72}, проведени върху същите маймуни, показват, че оцветяването е специфично само за пролиферативни клетки и не се натрупва в апоптични такива. Въз основа на тези данни в настоящото проучване не беше направено оцветяване с маркери за апоптоза.

2.7. Фенотипен анализ на APLNR в нормален човешки мозък

За целите на фенотипизацията на APLNR⁺ клетки в нормален мозък (без следи от патологични или невро-психиатрични промени) бяха използвани три човешки мозъка, дисецирани от едни и същи изследователи, като са прилагани винаги едни и същи анатомични обекти за ориентация. Всички дисецирани мозъци бяха взети от рутинни аутопсии с post-mortem период <24h. Дисецираните тъкани съдържаха предната част на латералния вентрикул заедно с подлежащата част на n. caudatus. След направената дисекция тъканите бяха промити за кратко в PBS, а след това фиксирани в пресен 4% разтвор на PFA за 24h на 4°C. Последва 24h измиване с чешмяна вода и последващо криопротектиране с нарастваща концентрация сукроза (10, 15, 30% разтвор). Впоследствие бяха поставени на -80°C в О.С.Т. (Tissue-Tek О.С.Т. (Optimal Cutting Temperature) Compound, Sakura, USA) за едно денонощие. Замразените препарати бяха нарязани на криостатен микротом (Leica CM3050S) на тъканни срези с дебелина 25 µm. Препаратите бяха оставени да изсъхнат на 37°C за едно денонощие. На следващия ден препаратите бяха подложени на антигенно възстановяване (DAKO PT Link, Germany) в цитратен буфер (pH 6) на 97°C за 5 минути с последващо охлаждане на лед за 30 минути. Препаратите бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и блокирани за 1 час с 10% (Cat. No S-1000, Vectorlabs) нормален

кози серум, разтворен в PBS с 0.1% Tween-20. Първичните антитела (Таблица 2) бяха инкубирани в комбинация с блокиращ разтвор за едно денонощие на 4°C. На следващия ден стъклата бяха промити в PBS 3 пъти по 5 минути и инкубирани за 2 часа на стайна температура с вторични антитела (Таблица 3), конюгирани с AlexaFluor-488, 555 или 647 (Thermo Fisher Scientific, Germany). След това стъклата бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и бяха покрити с покривна среда (ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, USA)⁴³. Препаратите бяха заснети с помощта на епифлуоресцентен микроскоп Zeiss AxioImager Z.2 (Carl Zeiss GmbH), снабден с напълно моторизирана предметна масичка и монохромна CCD камера AxioCam Mrm rev.3 (Carl Zeiss GmbH). Преброяването на двойнопозитивните клетки беше осъществено ръчно на коронарни срези по продължение на вентрикула (дорзо-вентрално).

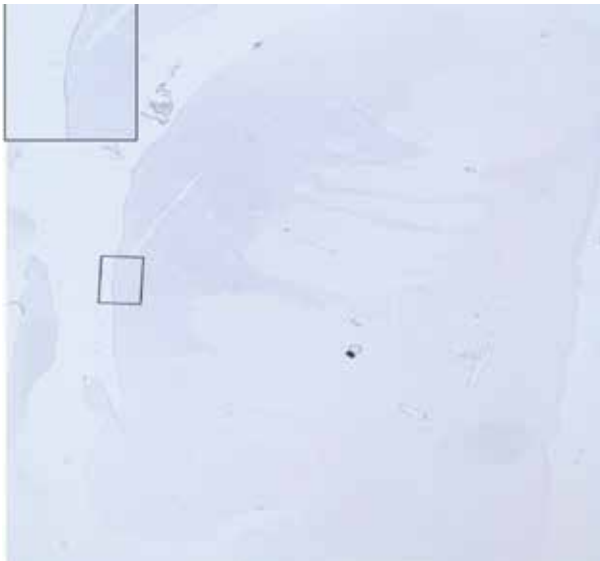
2.8. Контролни оцветявания и изследвания

1. Специфичността на ISH и имунохистохимичните оцветявания беше проверена чрез негативни и позитивни контролни оцветявания.

2. При осъществяване на полимеразно-верижната реакция (PCR) използвахме позитивна контрола за CALB1 с изключване на Taq полимеразата. При тези амплификации не бяха наблюдавани ДНК бандове при анализа на резултатите от гел електрофорезата.

Негативни контролни оцветявания:

1. ISH, FISH: Негативните контроли за ISH и FISH бяха оцветени с всички стъпки с изключение на инкубацията със самата РНК рибопроба. При всички препарати, третирани в отсъствието на РНК рибопроба, не се наблюдаваше оцветяване (Фиг. 2.5.).



Фиг. 2.5: Препарат, инкубиран в отсъствие от рибопроба, не показва оцветяване (негативна контрола).

2. Антитела: При оцветяването с антитела срезите бяха оцветени с осъществяване на всички стъпки с изключение на инкубацията с първични антитела. Всички препарати, третирани в отсъствие на първични антитела, останаха имунонегативни.

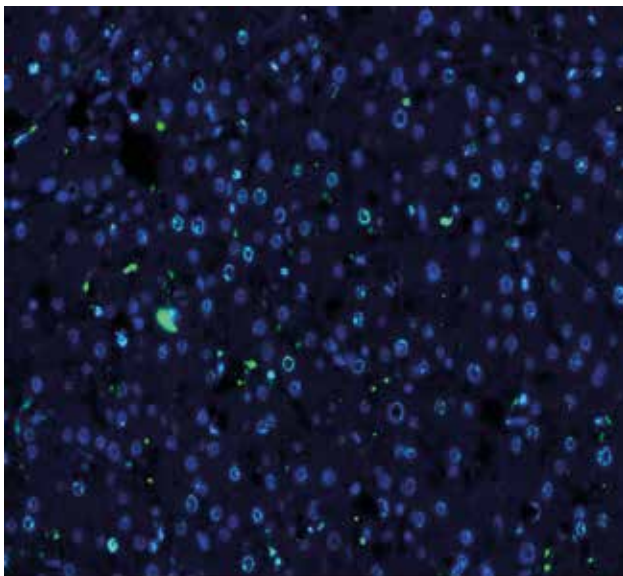
3. BrdU: За да изключим фалшиво позитивно оцветяване за BrdU, заедно с тъканите от маймуните, инжектирани с BrdU, бяха направени и паралелни оцветявания от тъкани на маймуни, които не са третирани с BrdU. В допълнение направихме и негативни контроли, при които не инкубирахме антитяло срещу BrdU. И при двата описани случая не наблюдавахме оцветяване за BrdU.

4. PCR: При осъществяване на полимеразно-верижната реакция използвахме негативна контрола, включваща всичко останало с изключение на Taq полимеразата. При тези амплификации не бяха наблюдавани ДНК бандове при анализа на резултатите от гел електрофорезата.

Позитивни контроли:

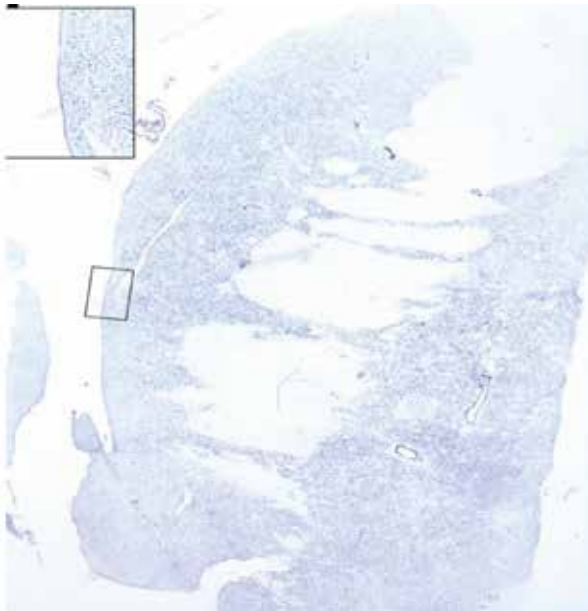
1. За потвърждаване на специфичното оцветяване на BrdU бяха използвани тъкани с наличие на пролифериращи клетки (чревен епител), взети от маймуни, третирани с BrdU. Последните показаха ясно ядрено оцветяване.

2. За тестване специфичността на използваните антитела направихме имунохистохимични оцветявания на срези, взети от органи, където има данни за експресията на дадения протеин (например APLNR - черен дроб; Фиг. 2.6.).



Фиг. 2.6: Препарат, инкубиран с антитяло за APLNR, показва специфично оцветяване за протеина в чернодробна тъкан.

3. Като контролно позитивно оцветяване за ISH и FISH беше използвана пробата CALB1 (Calbindin 1) в концентрация 100 ng/ml поради обилната му експресия в ЦНС (Фиг. 2.7.).



Фиг. 2.7: Препарат, инкубиран с рибопроба за CALB1, показва специфично оцветяване за този ген и беше използван като позитивна контрола.

2.9. Заснемане на препаратите

Препаратите бяха наблюдавани и заснети с помощта на Axio Vision 4.9 software (Carl Zeiss GmbH) на епифлуоресцентен микроскоп Zeiss AxioImager Z.2 (Carl Zeiss GmbH), снабден с напълно моторизирана предметна масичка и монохромна CCD камера AxioCam Mrm rev.3 (Carl Zeiss GmbH). За целта на нашите експерименти препаратите бяха снимани по два начина:

1. Висококачествена обзорна снимка (снимана на мозайка) на перивентрикуларната тъкан, заснета с обектив EC Plan-Neofluar 20x/0.50 с латерална резолюция от 0.65 $\mu\text{m}/\text{px}$.

2. От 3 до 5 снимки на полета от SVZ на предметно стъкло с функцията z-stack, заснети с обектив EC Plan-Neofluar 40x/0.75 с латерална резолюция от 0.325 $\mu\text{m}/\text{px}$ и аксиална резолюция (z-разстояние) между

0.125 и 0.55 μm . Z-стаковете бяха заснети като секвенция, започващи от най-дорзолатералния ръб на вентрикула в движение към медиалната равнина. С получените по този начин снимки продължихме по-нататъшната обработка.

Камерата беше настроена с бининг фактор (от англ. Bining Factor) 2x2 с цел да се намали времето на сканиране на препаратите и фоновия шум на камерата.

Засенчването (от англ. Shading) от неравномерното осветително поле беше коригирано по време на заснемането чрез вградената в камерата корекция на засенчване, като за целта бяха използвани предварително записани изображения на осветителното поле от флуоресцентни тестови слайдове. Всички настройки на камерата за различните канали бяха поддържани постоянни. Когато беше необходимо, експозицията беше вариабилна, за да се избегне насищането, което е много по-вредно за анализа на изображението, отколкото разликите във времето на експозиция. Изображенията бяха запазени в естествения необработен формат (.zvi) на софтуера Axio Vision и след снаждане (от англ. Stitching) на отделните изображения от заснет препарат бяха експортирани в 16-битов TIFF формат за по-нататъшна обработка и анализ.

2.10. Обработка на изображенията

Основната ни цел беше да намалим зависещото от оператора системно отклонение и да създадем автоматизиран алгоритъм за обработка и анализ на изображения с унифициран, възпроизводим подход към набор от изображения с променливо разпределение на яркостта на сигнала и/или фона.

Обработката и анализът на изображенията бяха извършени в софтуера FIJI/ImageJ^{126,127} и отчасти в CellProfiler^{128,129}. Всички изображения бяха обработени по един и същ алгоритъм.

1. 2-D проекция на z-stack

Срезите с дебелина 20 μm съдържат пространствена 3-D информация. Ние решихме да заснемен Z-stack от зоните на интерес и да направим 2-D проекция на фокусираните пиксели. За тази цел използвахме алгоритъм за Smooth manifold extraction^{130,131} с плъгин SME projection на FIJI/ImageJ (<https://github.com/biocompibens/SME/>). Алгоритъмът ефек-

тивно екстрахира само фокусираните участъци от z-стака и премахва светлината извън фокус, която може да затрудни сегментирането и обработката на образите.

2. Премахване на шума (от англ. Denoising)

Получените проекционни изображения бяха преработени за отстраняване на излишния шум с алгоритъм „Non Local Means“ с автоматично изчисляване на стандартното отклонение (сигма) на шума¹³², използвайки отново софтуера FIJI/ImageJ (https://imagej.net/Non_Local_Means_Denoise)

3. Филтриране тип Top-Hat

Филтрирането от типа „Top-Hat“ беше извършено, използвайки библиотеката „MorphoLibJ“¹³³, налична в софтуера FIJI/ImageJ (<https://imagej.net/MorphoLibJ>). Филтрирането тип „Top-Hat“ е тип морфологичен филтър. Структурен елемент с познати големина и размери се сравнява с елементите, налични в изображението, и то се филтрира въз основа на отношението му към този структурен елемент¹³⁴. Този вид морфологично филтриране разчита на морфологично „отваряне“ (англ. Opening), което се изважда от оригиналното изображение. Самото морфологично „отваряне“ е последователност от „ерозия“ (премахване на пиксели от изображението, които съответстват на структурния елемент), което е последвано от „дилатация“ (прибавяне на пиксели към обект, към който структурният елемент не пасва). Тази процедура премахва обекти, по-малки от структурния елемент, като запазва големината на останалите елементи. Обратната процедура се нарича „затваряне“, при която дилатацията е последвана от ерозия, което води до премахване на „дупки“ (тъмни полета), по-малки от структурния елемент.

Тъй като „отварянето“ премахва всеки обект с размер, по-малък от размера на структурния елемент, резултатът от него е еквивалентен на фона, който не съдържа „интересуващите“ ни обекти. Съответно „Top-Hat“ (top minus hat) е процедура за изваждане на фона, която запазва само обекти със същия или по-малък размер от този на използвания в отварянето структурен елемент.

За да намалим възможните артефакти, изпълнихме филтъра „Top-Hat“ със следните модификации:

а. Вместо да използваме „класическо“ отваряне и затваряне (както беше описано по-горе), ние извършихме отваряне чрез реконструкция. По този начин ерозията на изображението се реконструира чрез геодезическа дилатация, докато се „побере“ в оригиналното изображение (вместо да се използва структурният елемент)¹³⁴.

б. Преди „отваряне чрез реконструкция“ фоновите „дупки“, които могат да създадат фалшиви пикове след изваждането, бяха премахнати чрез „затваряне чрез реконструкция“ – дилатация, последвана от геодезическа ерозия.

Изследваните маркери и техните канали на различните слайдове бяха разделени според очакваното сходство в локалното пространствено разпределение на сигнала на изображението в три групи - (i) DAPI и BrdU; (ii) FISH изображения и (iii) извънядрени FHC (флуоресцентна имунохистохимия в комбинация с FISH) изображения. Изображенията на всяка група бяха измерени чрез гранулометрия и горната граница на доверие ($p = 0,05$) на средния геометричен размер на характеристичните обекти за групата беше избрана като радиус r на структурния елемент (максимален размер на запазените частици) за филтриране тип „Top-Hat“. По този начин DAPI, BrdU и FHC на ядрени антигени бяха обработени с $R=13px$, докато FISH и извънядрени FHC изображения с $R=11px$.

Стъпките на процедурата за „Top-Hat“ бяха, както следва:

1. Морфологична дилатация на оригиналното изображение с дискоиден структуриращ елемент с радиус r .
2. Морфологична реконструкция чрез „ерозия“ на разширеното изображение от оригиналното изображение (начало = разширено изображение, маска = оригинално изображение, свързаност = 8).
3. Морфологична ерозия на затвореното изображение с дискоиден структуриращ елемент с радиус r .
4. Морфологична реконструкция чрез разширяване на „ерозирания“ изображение от „затвореното“ изображение (начало = разширено изображение, маска = затворено изображение, свързаност = 8), което е приближение на фона без обектите, по-малки от r .
5. Аритметично изваждане на фона от оригиналното изображение.

4. Z-нормализиране на яркостта на изображението

$$Z_{\text{pixel}} = \frac{\text{Pixel intensity} - \text{Mean intensity}}{\text{Standard Deviation of intensity}}$$

(Средна яркост = 0 и стандартно отклонение = 1).

По този начин стойността на всеки пиксел е равна на броя на стандартните отклонения на неговата яркост от средната яркост на изображението (например стойността на пиксела от -1 означава, че яркостта на този пиксел е едно стандартно отклонение по-ниска от средната яркост на изображението преди трансформацията).

5. Генериране на региони на интерес (RoIs)

DAPI каналите бяха допълнително сегментирани с помощта на софтуера CellProfiler чрез алгоритъм, основан на интензитет и форма. Настройките на програмата бяха единствената стъпка, когато параметрите за обработка бяха подбрани от човешки оператор. Клетъчни RoIs бяха генерирани чрез разширяване на ядрените RoIs с 2 μm , като се контролираше припокриването: за граници между припокриващи се RoIs използвахме границите на трансформацията на Voronoi на сегментираните ядра. Оцветяването с BrdU намалява качеството на оцветяването и съответно и на DAPI. Ето защо ние обработихме канала BrdU (където присъства) със същите настройки като DAPI изображенията и добавихме тези RoI, които не се припокриват с генерираните от DAPI RoIs. По този начин премахнахме възможно отклонение, въведено от по-слабото/липсващо DAPI оцветяване (особено в BrdU-позитивните ядра). Като последна стъпка за анализ бяха избрани само онези региони на интерес, които бяха открити в рамките на 150 μm от основата на епендимния слой.

6. Прагова обработка min „Z-score“

По-голямата част от всяко флуоресцентно изображение е заета от фон. Факт, който може да се интерпретира, че сигналът заема положителни отдалечени пиксели (със стойност на сивото, по-голяма от няколко стандартни отклонения в положителна посока от средната стойност на изображението). Значителна част от всеки останал фон от измервателните (т.е. не-DAPI) канали беше изключен от анализа чрез задаване

на 0 за всички пиксели с Z-резултат, по-малък от 1 (по-вероятно е да принадлежат към фона).

2.11. Анализ на изображенията

1. Класификация на RoI

Класификацията на RoI беше извършена полуавтоматично с персонализиран скрипт за броене в софтуера FIJI/ImageJ. Скриптът извършва последователно следните действия: (i) зарежда RoI-набора и обработените канали на изображението, които трябва да бъдат измерени, (ii) изолира сигнала чрез итеративен прагов алгоритъм на Li (thresholding) за минимизиране на кръстосаната ентропия към всеки канал, (iii) измерва положителната част на площта във всеки „клетъчен” RoI във всички заредени канали, (iv) присвоява етикет според „положителността“ на RoI във всеки канал, (v) рисува аотирано изображение на RoIs и (vi) отчита броя на RoI, принадлежащи към всеки клас. В зависимост от различните комбинации от експресия на маркера (положителна или отрицателна) различните RoIs са обозначени като принадлежащи към един от 8 (когато са измерени три канала) или 4 (при два канала оценки) класове.

2.12. Обработка на данните и статистика

За избора на подходящи прагове на припокриване за алгоритъма за класификация ние извършихме анализ на ROC кривата¹³⁵ на няколко мерки (средна сива стойност, необработена интегрирана плътност, част от площта от сигнала след автоматичния прагов алгоритъм по Li (който автоматично изчислява глобален праг за разделяне на сигнал от фон) от ~300 произволно избрани RoIs в SEL, които са оценени от опитен изследовател като положителни или отрицателни за всеки маркер, записан в съответните изображения. ROC кривите показаха добро съответствие между трите мерки и класификацията от експерта и фракцията на надпраговата площ по Ли беше избрана като най-лесна за прилагане в скрипта за автоматизация на броенето. Изображенията бяха разделени на три групи в зависимост от основния тип на открития маркер и

очакваните прилики в тяхното локално пространствено разпределение – FISH, ядрени маркери и извънядрени IHC маркери. Праговете бяха изчислени за всяка група поотделно: за FISH изображения и извънядрени IHC изображения бяха избрани прагове (вижте в анализа на изображения), които максимизират сумата от чувствителност (дял на истински позитивните резултати) и специфичност (дял на истински негативните резултати), докато за ядрените маркери поради малкия относителен брой на положителни клетки предпочетохме да максимизираме специфичността.

От данните за преброяване генерирахме абсолютни и относителни честотни таблици за всяка валидна комбинация от изследвани маркери (т.е. маркери, оценени заедно в един или повече слайдове). Поради нехомогенния характер на данните ние избрахме да генерираме интервали на доверителност за фракциите от клетъчните класове чрез непараметрично генериране на псевдоизвадки тип “Монте Карло”^{136,137}. Ние разработихме схема за случаен подбор на извадки от измерените клетки, която симулира начина, по който реално се броят клетките: всеки набор от класифицирани RoIs за валидна комбинация от маркери (оцветени и оценени заедно в едни и същи изображения) бяха изследвани чрез 100 000 произволни подизвадки с произволен размер, равен на 25–75% от броя на RoIs в комплекта. Всяка подизвадка се генерира чрез случаен подбор със заместване¹ от общия набор валидни RoIs. Този подход с променливо големи подизвадки от клетки имитира начина, по който клетките се броят на изображения с различен размер на зоните за вземане на проби (различно големи части от SVZ) – обикновено на различно големи изображения, различно голяма площ от SVZ се избира за клетъчно броене. Ако приемем, че всички клетки, проверени за определена комбинация от маркери, са представителни за цялата популация от клетки (например клетки във възрастни SEL на примати от контролна група), тогава подизвадката симулира преброяването на множество (например 100 000 изображения). Този подход се основава само на измерените данни и по този начин може да осигури добра оценка на грешката в нашите измервания и трябва да се интерпретира само от тази глед-

1 Случаен подбор със заместване се извършва, като след всеки избран член на съответната извадка той се връща в общия набор за последващ случаен избор. Така наборът от елементи за подбор става безкрайно голям.

на точка (но не и като представителна за цялата популация животни). Разликите между наблюдаваните и всяка от повторно взетите средни фракции на съответните клетъчни класове бяха изчислени и квантилите 0,025 и 0,975 бяха използвани като оценки на долната и съответно горната граница на 95% доверителен интервал (т.е. интервала при $p = 0,05$) за всяка клетъчна фракция¹³⁷. Обработката на данни (например генериране на честотните таблици) и анализът бяха извършени с помощта на софтуер R language and environment for statistical computing v.3.4.4¹³⁸ в RStudio IDE¹³⁹ и допълнителни библиотеки tidyverse, pROC, vcd, vcdExtra и epitools^{140,141}.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Анализ на характеристиката на експресия на гените в публичната база данни monkey-niche.org

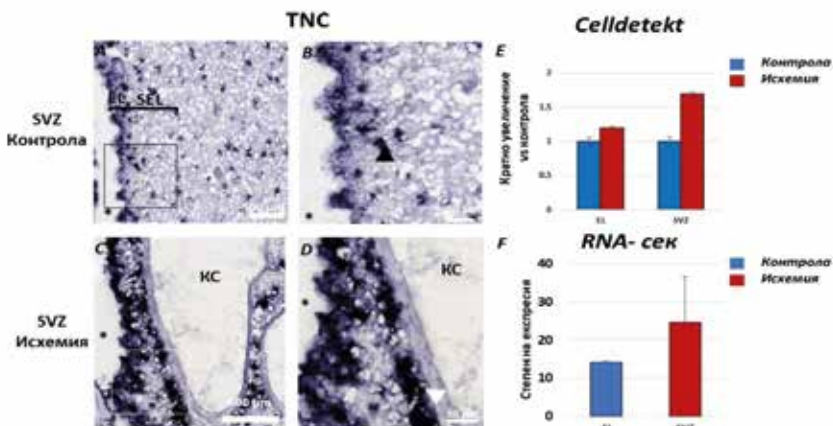
За да разберем по-добре характеристиката на експресия на различни гени с повишена експресия в предната субвентрикуларна зона в норма и след исхемично увреждане, използвахме публичната свободна дигитална база данни monkey-niche.org. Тази информационна система включва 150 гена, функционално свързани със стволото-клетъчната биология⁴³. Всички гени бяха визуално инспектирани за нива на експресия в четири зони на интерес и бяха анотирани спрямо нивото им на експресия.

3.2. Анализ на характеристиката на експресия на TNC (Tenascin-C)

При визуалното оценяване на образите от Monkey-Niche, демонстриращи експресията на TNC, наблюдавахме следното: при контролната маймуна се наблюдават единични клетки с умерена експресия на mRNA в SVZ (+). Наблюдава се също умерена до силна експресия в EL (+). За разлика от здравата контрола, при исхемичното животно клетките са групирани в клъстери със силна експресия (+++). В допълнение

се наблюдава и засилено присъствие на позитивни клетки около кръвоносни съдове (PVSZVZ +), което при контролата липсва (-). Експресията в епендимния слой е засилена (+++) в сравнение с контролните оцветявания (Фиг. 3.1.).

Количественото определяне със CellDetekt показва, че експресиращите TNC клетки в EL нарастват средно 1.2 пъти (EL – кратно увеличение – 1.2, 95% интервал на доверителност 46.52% – 59.02%) след глобална исхемия в сравнение с контролните животни (EL – 1, 95% интервал на доверителност 20.20–32.08%), докато експресиращите TNC клетки в SVZ нарастват средно 1.7 пъти (SVZ – 1.7, 95% интервал на доверителност 29.18–34.58%) спрямо контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 15.78–20.98%) (Фиг. 3.1 E). Същите резултати бяха наблюдавани и при сравнение на транскриптомните данни (Фиг. 3.1 F). Нито при контролните, нито при исхемичните оцветявания се установяват данни за дорзо-вентрален градиент на експресия.



Фиг. 3.1: (А-В) Оцветяване за иРНК на TNC в норма:

- (А). (А) представя SVZ, съдържаща EL и SEL при контрола. Наблюдава се умерена ISH експресия както в EL, така и в SVZ. (В). Увеличение на маркираната зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и умерена експресия по цялата дължина на епендимата. (С-Д). Оцветяване на иРНК на TNC след исхемия: (С). (С) представя SVZ, съдържаща EL, SVZ и кръвоносен съд (КС)

след исхемия. Наблюдава се силна експресия както в EL, така и в SVZ с масивни конгломерати от клетки (бяла стрелка в D.) със засилено присъствие около КС. (D). Увеличение на С, показващо множество клетки в непосредствена близост до кръвоносния съд (бяла стрелка) и директно под епендимния слой.

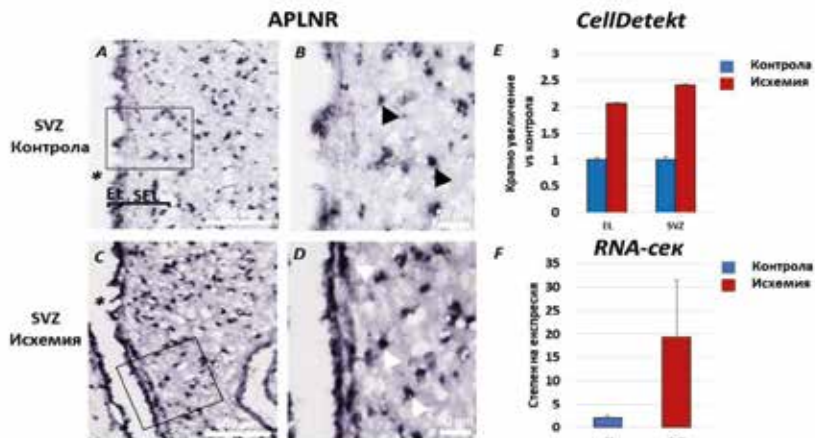
(E). Данни от измерване със CellDetekt. Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия.

(F). Данни от транскриптомния анализ (RNA-seq)⁴³. Относителна експресия на TNC, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия. С* е отбелязан латералният вентрикул. КС- кръвоносен съд.

3.3. Анализ на характеристиката на експресия на APLNR (Apelin receptor)

На препаратите, качени в monkey-niche.org и оцветени за mRNA на APLNR, наблюдавахме единични клетки със слаба експресия в SVZ (+) (Фиг.3.2). Открива се също слаба експресия в EL (+). При исхемия клетките са групирани в клъстери непосредствено под EL и са със силна експресия (+++). Експресията в епендимния слой е многократно по-силена в сравнение с контролните оцветявания. При контролните оцветявания не се наблюдава оцветяване периваскуларно (-), което обаче е налице при исхемичните животни (+).

Количествената оценка със CellDetekt показва, че експресиращите APLNR клетки в EL нарастват средно 2 пъти (EL -кратно увеличение – 2.065, 95% интервал на доверителност 46.75–59.95%) след глобална исхемия в сравнение с контролните животни (EL – 1,95% интервал на доверителност 20.29–31.21%), докато тези в SVZ нарастват средно 2.4 пъти (SVZ – 2.411, 95% интервал на доверителност 10.36–15.36%) спрямо контролните животни (SVZ - 1, 95% интервал на доверителност 3.52–7.05%) (Фиг. 3.2 E). Транскриптомните данни показват ~18-кратно нарастване на транскриптите в сравнение с контролата. Нито при контролните, нито при исхемичните оцветявания имаше данни за дорзо-вентрален градиент на експресия (Фиг.3.2 F).



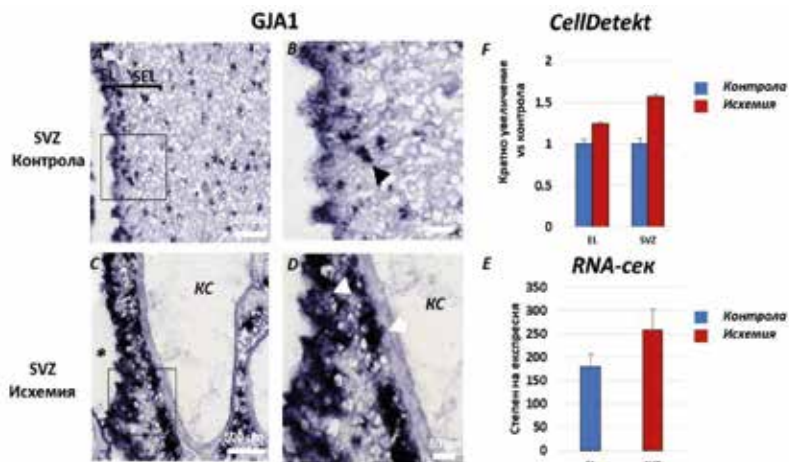
Фиг. 3.2: (А-В) Оцветяване за иРНК на APLNR в норма: На (А) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SVZ. Нашите наблюдения показват слаба ISH експресия както в EL, така и в SVZ. (В). Увеличение на маркираната зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и ниска експресия по цялата дължина на епендимата. (С-Д). Оцветяване за иРНК на APLNR при исхемия:(С). На (С) се наблюдава SVZ, съдържаща EL, SEL при исхемия. Забелязва се много силна експресия както в EL, така и в SVZ с наличие на групички от клетки (бяла стрелка в D). (D). Увеличение на С, показващо множество клетки в непосредствена близост и директно под епендимния слой. (Е). Данни от измерване със CellDetekt. Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия. (F). Данни от транскриптомния анализ⁴³. Релативна експресия на APLNR, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия. С * е отбелязан латералният вентрикул.

3.4. Анализ на характеристиката на експресия на GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein)

При препаратите, оцветени за mRNA на GJA1, наблюдавахме единични клетки със слаба до умерена експресия в SVZ (++) . Наблюдава се също слаба експресия в EL (+). При исхемичните животни непосред-

ствено под EL се оформят отново клъстери от клетки със силна експресия (+++). Забелязва се и увеличена експресия около кръвоносни съдове (PVSEL +), като в самата съдова стена оцветяване не е налично. SVZ също демонстрира засилено оцветяване за mRNA на GJA1 в сравнение с контролите (+++).

Количественото определяне със CellDetekt и транскриптомните данни потвърждават увеличението на генната експресия на GJA1 след исхемия (Фиг. 3.3 Е и F). От направените измервания установихме, че GJA1+ клетки в EL се повишават 1.2 пъти след исхемия (EL - кратно увеличение – 1.240, 95% интервал на доверителност 42.24–55.35%) спрямо животните без исхемия (EL – 1, 95% интервал на доверителност 33.28–45.40%). В SVZ се наблюдава кратно нарастване от 1.5 пъти (SVZ – 1.576, 95% интервал на доверителност 19.24–24.58%) спрямо същия регион при контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 11.48–16.24%). И при двете оцветявания не се наблюдава дорзо-вентрален градиент.



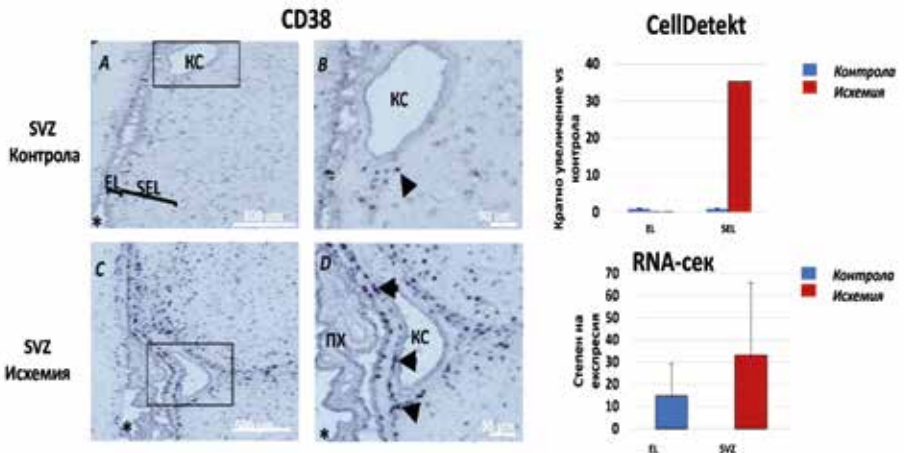
Фиг. 3.3: (А–В) Оцветяване за иРНК на GJA1 в норма: (А). На (А) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SEL при контролно животно. Наблюдава се умерена ISH експресия както в EL, така и в aSVZ. (В). Увеличение на обозначената зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и умерено наличие на mRNA по цялата дължина на епендимата.

(C–D). Оцветяване на иРНК на GJA1 при исхемия:(C). На (C) се наблюдава SVZ, съдържаща EL, SEL и кръвоносен съд (КС), при исхемия. Наблюдава се много силна експресия както в EL, така и в SVZ с масивни струпвания от клетки (бяла стрелка в D.) около КС. (D). Увеличение на C, показващо множество клетки в непосредствена близост до кръвоносния съд (бяла стрелка) и директно под епендимния слой. **(E).** Данни от измерване със CellDetekt. Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия. **(F).** Данни от транскриптомния анализ (RNA-seq)⁴³. Релативна експресия на GJA1, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия. C * е отбелязан латералният вентрикул.

3.5. Анализ на характеристиката на експресия на CD38 (Cluster of differentiation 38)

При препаратите, оцветени за mRNA на CD38, наблюдавахме единични клетки със слаба до умерена експресия в SVZ (+). Наблюдава се също липса на експресия в EL (-). При исхемичните животни непосредствено под EL се оформят отново клъстери от клетки със силна експресия (+++). Забелязва се и увеличена експресия около кръвоносни съдове (PVSEL +), като в самата съдова стена оцветяване не е налично. SVZ също демонстрира засилено оцветяване за mRNA на CD38 в сравнение с контролите (+++).

Количественото определяне със CellDetekt и транскриптомните данни потвърждават увеличението на генната експресия на CD38 след исхемия (Фиг. 3.4 E и F). От направените измервания установихме, че CD38⁺ клетки в EL не се наблюдава повишение след исхемия спрямо животните без исхемия. В SVZ се наблюдавакратно нарастване от 30 пъти (SVZ - 30, 95% интервал на доверителност 28.09–33.45%) спрямо същия регион при контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 13.33–15.33%). И при двете оцветявания не се наблюдава дорзо-вентрален градиент.



Фиг. 3.4: (А–В) Оцветяване за иРНК на CD38 в норма: (А). На (А) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SEL при контролно животно. Наблюдава се умерена ISH експресия както в EL, така и в aSVZ. (В). Увеличение на обозначената зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и умерено наличие на mRNA по цялата дължина на епендимата. (С–D). Оцветяване на иРНК на CD38 при исхемия: (С). На (С) се наблюдава SVZ, съдържаща EL, SEL и кръвоносен съд (КС), при исхемия. Наблюдава се много силна експресия както в EL, така и в SVZ с масивни струпания от клетки (бяла стрелка в D.) около КС. (D). Увеличение на С, показващо множество клетки в непосредствена близост до кръвоносния съд (бяла стрелка) и директно под епендимния слой. (Е). Данни от измерване със CellDetekt. Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия. (F). Данни от транскриптомния анализ (RNA-seq)⁴³. Релативна експресия на CD38, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия. С * е отбелязан латералният вентрикул.

3.6. Фенотипен анализ на избраните гени

Адултните невронални стволови/прогениторни клетки (от англ. Neuronal stem cells) са мултипотентни и могат да се самовъзпроизвеждат и поддържат популацията си, да пролиферират и да се диференцират в неврони и глия³. Стволовите/прогениторните клетки експресират протеините GFAP, Vimentin, GLAST, CD133, Nestin, ASCL1 (Mash1), EGFR, BrdU и др.16. Важно е да се отбележи, че няма единен маркер за откриването на отделните хетерогенни субпопулации от стволови/прогениторни клетки (qNSCs, aNSCs, TAPs, невробласти). Поради тази причина комбинацията от изброените по-горе маркери и изследваните от нас гени може да предостави по-ясна представа за характера на отделната субпопулация.

За тази цел използвахме следните флуоресцентни имунохистохимични или FISH оцветявания в съчетание с FISH за съответните гени на интерес:

1. GFAP (Glial fibrillary acidic protein) беше използван като маркер за qNSCs, aNSCs и паренхимни астроцити.

2. Vimentin беше използван като маркер за aNSCs, TAPs и ендотел.

3. BrdU (5-бромо-2'-дезоксисуридин) беше използван като маркер за делящи се клетки. Поради характера на апликацията на BrdU при експерименталните животни BrdU ще се инкорпорира главно в бързо делящите се клетки от типа TAPs и в някои делящи се aNSCs.

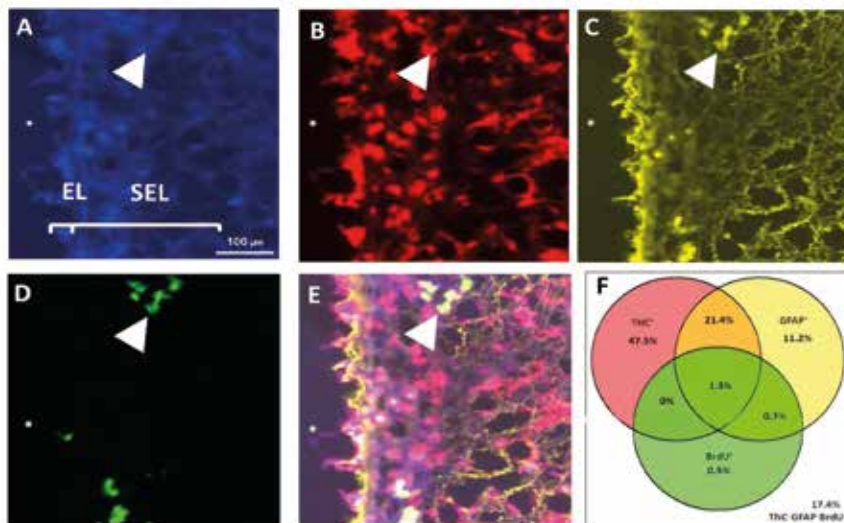
4. За характеризиране на APLNR⁺ популацията беше използван и GLUT1 (Glucose transporter 1) за бележени на кръвоносни съдове.

3.7. Фенотипен анализ на TNC (Tenascin-C)

Беше направено имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за TNC. Оцветяванията ни показаха наличие на TNC⁺/GFAP⁺ (22.9% от всички клетки в aSVZ), TNC⁺/Vimentin⁺ (27.3%) и TNC⁺/BrdU⁺ (1.4%) клетки.

За да разберем дали има пролифериращи GFAP⁺/TNC⁺ клетки, направихме и двойно имунохистохимично оцветяване за GFAP и BrdU в комбинация с FISH за TNC. От резултатите се вижда, че само 1.3% от

всички DAPI⁺ са тройнопозитивни клетки (TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺) (Фиг. 3.5 А–Е).

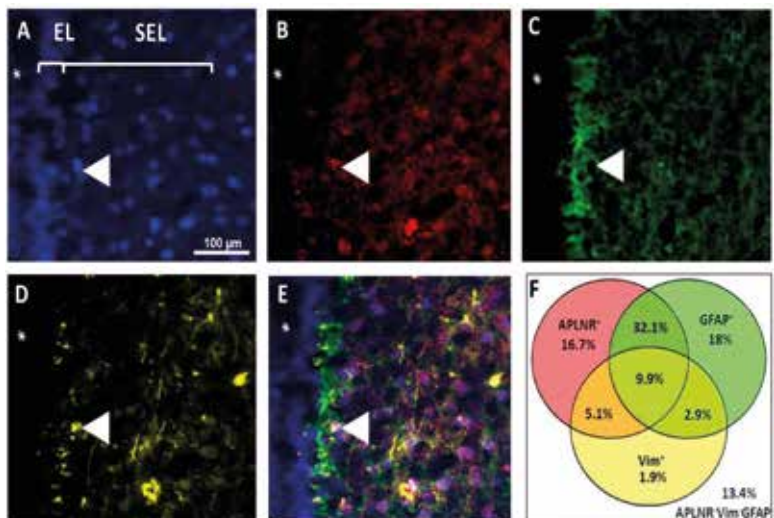


Фиг. 3.5: (А-Е) Оцветяване за mRNA на TNC (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (жълто) и BrdU (D) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка: TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: BrdU⁺, TNC⁺, GFAP⁺, BrdU⁺/TNC⁺, GFAP⁺/TNC⁺, GFAP⁺/BrdU⁺, TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺ и TNC⁻/GFAP⁻/BrdU⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

3.8. Фенотипен анализ на APLNR

Беше направено флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin, BrdU и Glut1 в различни комбинации с FISH за APLNR. Оцветяванията ни показаха наличие на APLNR⁺/GFAP⁺ (50.5% от всички клетки), APLNR⁺/Vimentin⁺ (26.5%), APLNR⁺/BrdU⁺ (1.9%) и APLNR⁺/Glut1⁺ (12.2%) клетки.

При тройно оцветяване за APLNR, GFAP и VIM установихме, че тройнопозитивните клетки APLNR⁺/GFAP⁺/VIM⁺ съставляват 9.9% от всички DAPI⁺ клетки (Фиг. 3.6 А-Е).



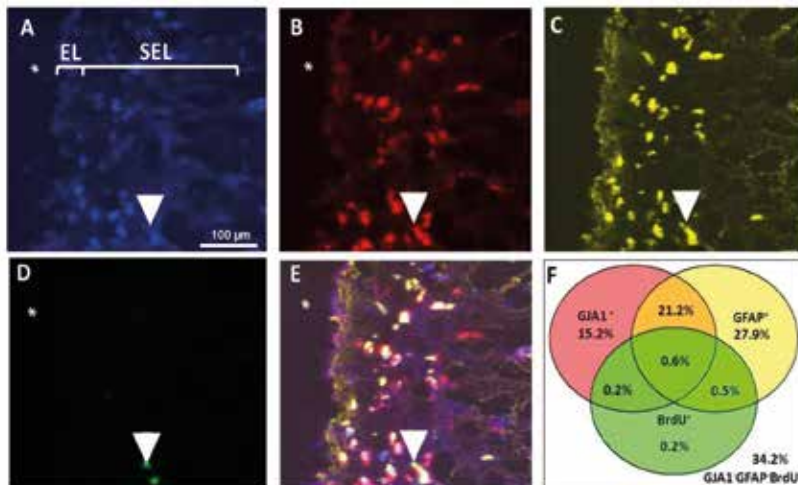
Фиг. 3.6: (А–Е) Оцветяване за mRNA на APLNR (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (зелено) и Vimentin (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка APLNR⁺/GFAP⁺/Vim⁺. (F) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Vim⁺, GFAP⁺, APLNR⁺/Vim⁺, APLNR⁺/Vim⁺/GFAP⁺ и APLNR⁻/GFAP⁻/Vim⁻ от всички клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

3.9. Фенотипен анализ на GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein)

Аналогично беше направен фенотипен анализ на GJA1 с гореописаните маркери. Беше направено флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за GJA1. Оцветяванията ни показаха наличие на GJA1⁺/GFAP⁺, GJA1⁺/Vimentin⁺ и

GJA1⁺/BrdU⁺ клетки. Процентното съдържание на двойнопозитивните клетки беше съответно 21.8%, 7% и 2%.

При тройна комбинация за BrdU, GFAP и GJA1 нашите резултати показват, че 0.6% от всички клетки са тройнопозитивни за GJA1, GFAP и BrdU. Единично позитивните клетки за GJA1 са 15.2%, за BrdU и GFAP съответно 0.2% и 27.9% (Фиг. 3.7 А–Е)



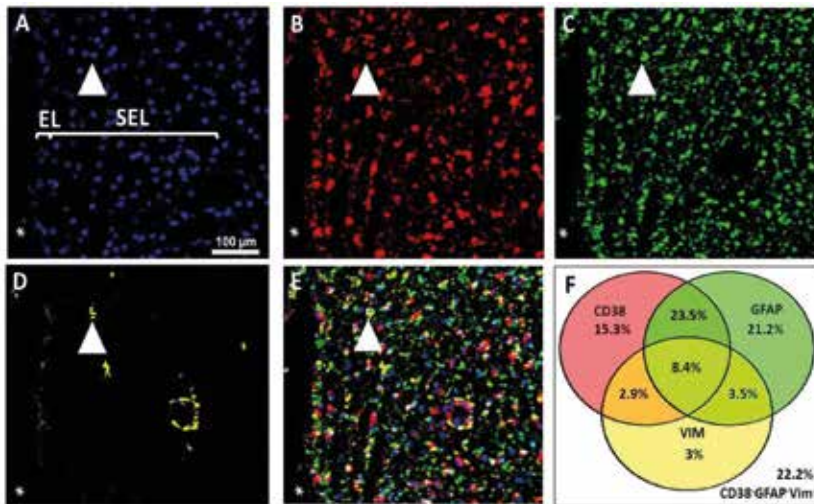
Фиг. 3.7: (А–Е) Оцветяване за mRNA на GJA1 (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (жълто) и BrdU (D) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани тройнопозитивни клетки GJA1⁺/BrdU⁺/GFAP⁺. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GJA1⁺, BrdU⁺, GJA1⁺/GFAP⁺, GFAP⁺/GJA1⁺, GJA1⁺/BrdU⁺ и GJA1⁻/BrdU⁻/GFAP⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

3.10. Фенотипен анализ на CD38

Беше направено имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за CD38. Оцветяванията ни показаха наличие на CD38⁺/GFAP⁺, CD38⁺/Vimentin⁺ и CD38⁺/BrdU⁺ клетки. Процент-

ното съдържание на двойнопозитивните клетки беше съответно 31.9%, 11.9% и 1.3%.

При тройна комбинация за VIM, GFAP и CD38 нашите резултати показват, че 8.4% от всички клетки са тройнопозитивни за посочените маркери (Фиг. 3.8 А–Е). Единично позитивните клетки за CD38 са 15.4%, за VIM са 3%, а тези за GFAP – 21.2%.

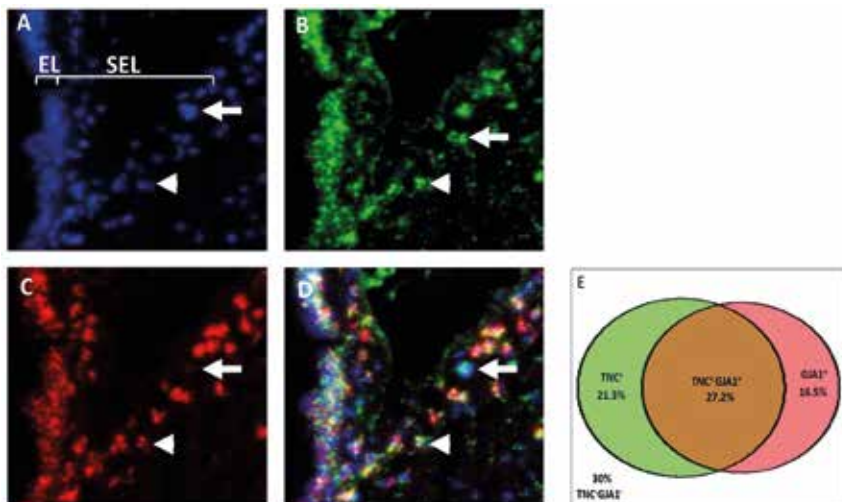


Фиг. 3.8: (А–Е) Оцветяване за mRNA на CD38 (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (зелено) и VIM (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка CD38⁺/GFAP⁺/VIM⁺. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GFAP⁺, CD38⁺, VIM⁺, GFAP⁺/CD38⁺, VIM⁺/CD38⁺, GFAP⁺/VIM⁺/CD38⁺, GFAP⁺/VIM⁺, GFAP⁻/VIM⁻/CD38⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

3.11. Коекспресия между някои от избраните гени

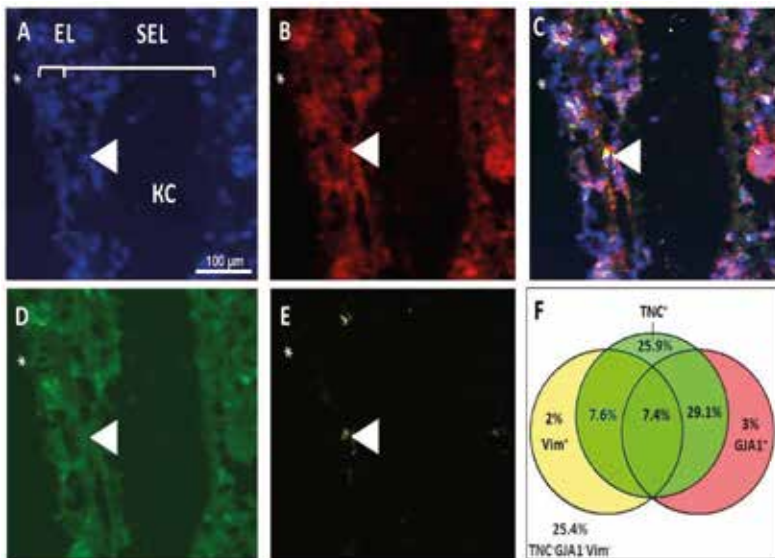
Тъй като TNC и GJA1 представляват субпопулация от qNSCs или aNSCs, ние използвахме двойно FISH оцветяване за двата гена и уста-

новихме, че 36.5% от всички клетки са двойнопозитивни за двата гена, докато 33.4% и 2.9% са единично позитивни съответно за TNC и GJA1 (Фиг. 3.9.). За да проучим фенотипа на откритата субпопулация от клетки, направихме двоен FISH в комбинация с имунохистохимично оцветяване на BrdU и Vimentin.



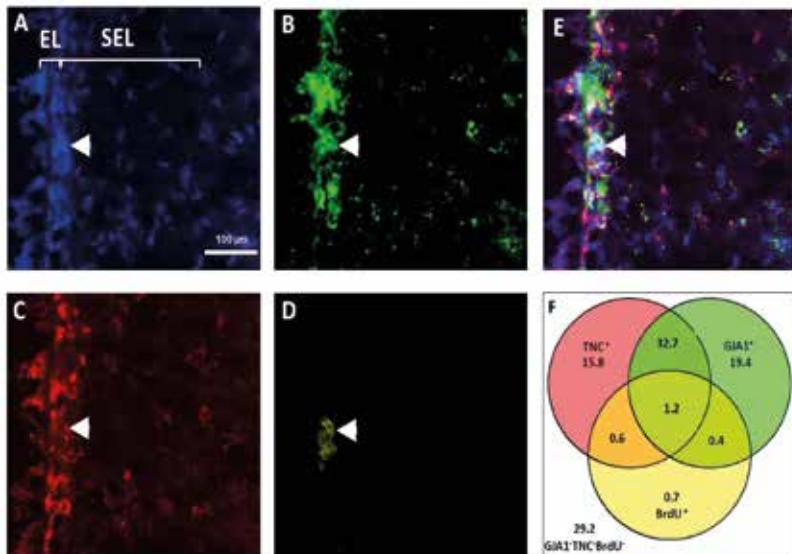
Фиг. 3.9: (A–D) Оцветяване за mRNA на TNC (B) (зелено) в комбинация с GJA1 (C) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана TNC⁺ клетка, която е негативна за GJA1. Със стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка GJA1⁺/TNC⁺. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: TNC⁺, GJA1⁺, TNC⁺/GJA1⁺ и TNC⁻/GJA1⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

След преброяването установихме, че тройнопозитивната субпопулация от TNC⁺/VIM⁺/GJA1⁺ клетки представлява 7.2%, докато дялът на двойнопозитивните за TNC⁺/VIM⁺ клетки е 7.9% (Фиг. 3.10.). Интересно е, че открихме наличието на субпопулация от TNC⁻/GJA1⁺/VIM⁺, а субпопулацията TNC⁻/GJA1⁺ не експресира Vimentin.



Фиг. 3.10: (А–Е) Оцветяване за mRNA на TNC (D) (зелено) в комбинация с GJA1 (B) (червено) и Vimentin (E) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). Със стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка GJA1⁺/TNC⁺/VIM⁺. (C) Показва компилация от (A), (B), (C) и (D). С глава на стрелка е отбелязана единично позитивна клетка GJA1⁺/TNC⁻/VIM⁻. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: TNC⁺, GJA1⁺, TNC⁺GJA1⁺ и TNC⁻/GJA1⁻/VIM⁻, VIM⁺/TNC⁺ и VIM⁺/GJA1⁺. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

Допълнително направихме и флуоресцентно имунохистохимично оцветяване на комбинацията TNC и GJA1 с BrdU (Фиг. 3.11.). От получените резултати установихме, че субпопулацията TNC⁻/GJA1⁺ не само не експресира Vim, но и не включва клетки, инкорпорирали BrdU в ядрото си.

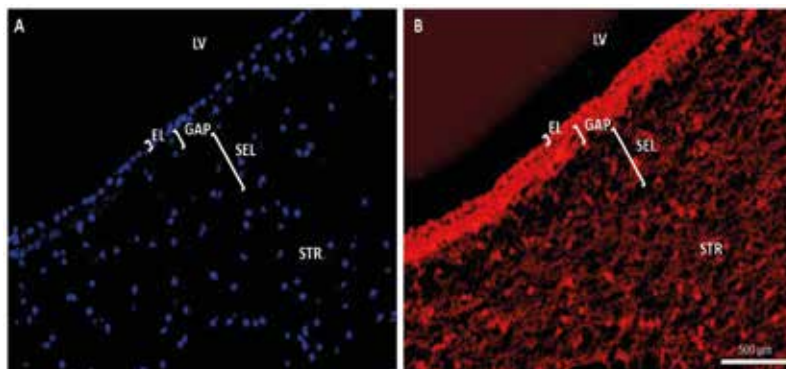


Фиг. 3.11: (A–E) Оцветяване за mRNA на GJA1 (B) (зелено) в комбинация с TNC (C) (червено) и BrdU (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана група от двойнопозитивни клетки за GJA1⁺/BrdU⁺, които са негативни за TNC. (F) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: TNC⁺, GJA1⁺, TNC⁺/GJA1⁺ и TNC⁻/GJA1⁻BrdU⁻, BrdU⁺/TNC⁺ и BrdU⁺/GJA1⁺ от всички клетки.

3.12. Фенотип на APLNR позитивни клетки в SVZ от нормален човешки мозък

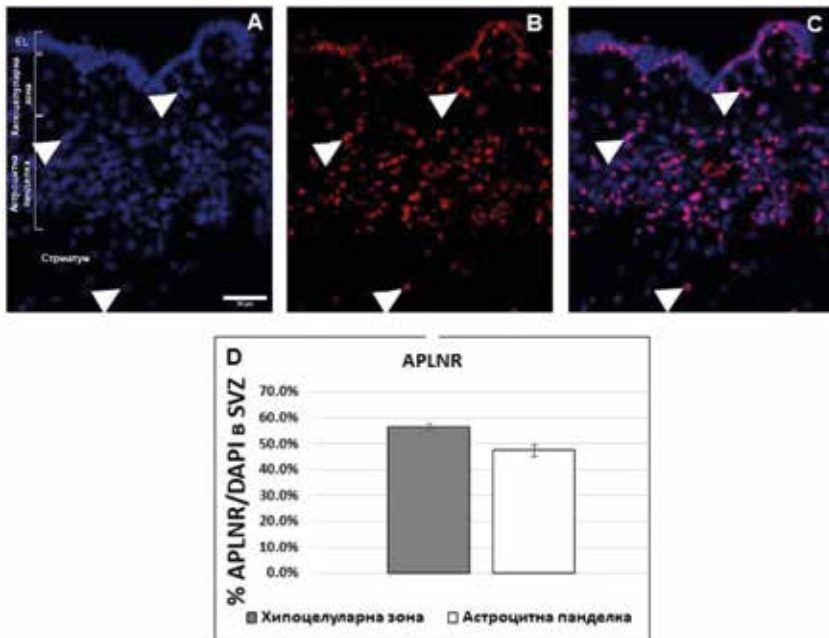
Високата експресия на APLNR в маймунския мозък, наличието на литературни данни за участието на апелинергичната система в нормални физиологични и патофизиологични процеси, както и фактът, че APLNR може да бъде използван като фармакологична мишена, ни мотивираха да задълбочим нашите изследвания върху експресията на APLNR в субвентрикуларната зона на нормален човешки мозък. За да разберем дали APLNR се експресира в тази зона, използвахме имунохистохимич-

ни методи, за да оцветим човешки мозъчни материали с пост-мортем интервал <24 часа (Фиг. 3.12.). Нашите резултати демонстрираха наличието на протеина в зоната на интерес. Човешката субвентрикуларна зона е изградена от три слоя: епендимен, гап зона и субепендимен слой, съдържащ астроцитна панделка (от англ. Astrocytic ribbon). Експресия на APLNR се наблюдава и в трите слоя на зоната.



Фиг. 3.12: (А–В) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). Прави впечатление силната експресия на APLNR в зоната на интерес.

Нашият статистически анализ показва, че в хипоцелуларната зона положителните клетки за APLNR са 56% (95% интервал на доверителност 55.63–57.12%) в сравнение с астроцитната панделка, където те са около 47% (95% интервал на доверителност 46.95– 47.88%) от всички клетки, маркирани с DAPI (Фиг. 3.13.).



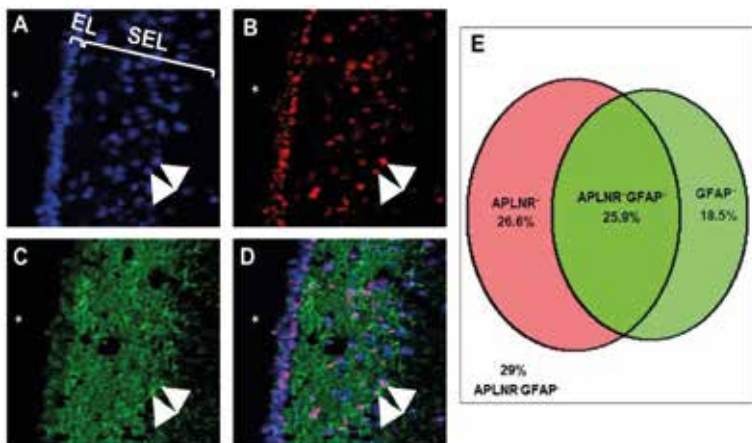
Фиг. 3.13: (А–С) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). (D) Процентно съдържание на APLNR в хипоцелуларната зона и астроцитната панделка на SVZ.

За да разберем кои клетъчни субпопулации в субвентрикуларната зона при човека експресират APLNR, ние направихме двойни имунохистохимични оцветявания за GFAP, GFAP-delta, DCX и Ki67.

От резултатите, получени при двойното флуоресцентно имунохистохимично оцветяване с APLNR и GFAP, открихме, че APLNR се експресира в GFAP+ клетки и техните израстъци в астроцитната панделка (от англ. Astrocytic ribbon) (Фиг. 3.14.). Установихме, че APLNR се експресира в GFAP+ клетки в SVZ. Двойното оцветяване с APLNR и GFAP, маркер за NSCs, както и за астроцити, показва, че от всички APLNR+ клетки в астроцитната лента средно 55% от тях са GFAP+ (95% интервал на доверителност 43.68–55.03%).

Ако сравним този процент между 3-те дорзо-вентрални области, можем да видим, че във вентралната SVZ съотношението на двойнопо-

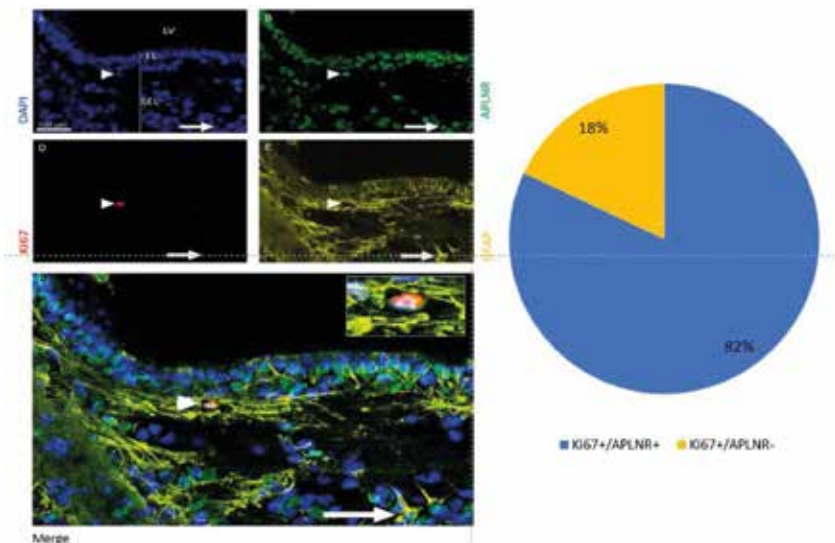
ложителните клетки спрямо общия брой на APLNR е значително увеличено. Трябва да се спомене, че GFAP не е специфичен маркер за NSCs, тъй като може да се експресира от паренхимни астроцити.



Фиг. 3.14: (А–С) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено) и GFAP (С) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (синьо). Забелязват се двойнопозитивни клетки за APLNR и GFAP, отбелязани с глава на стрелка в SEL. (Е) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, GFAP⁺, APLNR⁺/GFAP⁺ и APLNR⁻/GFAP⁻ от всички клетки.

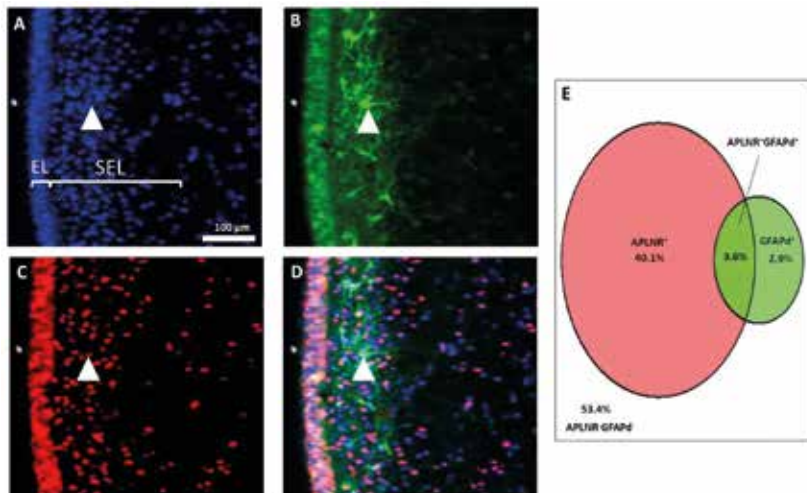
Ki67 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) е пролиферативен маркер, който бележи дялящите се клетки. За да установим количеството на дялящите се клетки в SVZ на човек и дали APLNR⁺ субпопулация пролиферира, използвахме тройно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване с антитела срещу APLNR, GFAP и Ki67 на човешки мозък в норма. Забелязахме, че Ki67⁺ клетки по цялата дължина на вентрикула са малко (17 клетки от общо n=3 преброени коронарни среза) (Фиг. 3.15.). От тези 17 клетки 14 са позитивни и за APLNR или 82% позитивни за APLNR от всички дялящи се клетки, 2 са позитивни и за APLNR, и GFAP, а една е негативна както за APLNR, така и за GFAP (Фиг. 3.15.).

Всички от тях се намират в слой II (gap zone) или слой III (astrocytic ribbon).



Фиг. 3.15: (А-Е) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (зелено), Ki67 (D) (червено) и GFAP (Е) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана единична двойнопозитивна клетка за APLNR и Ki67. Със стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и GFAP. Микрографията в горния ляв ъгъл на (С) показва увеличение на Ki67⁺ клетка.

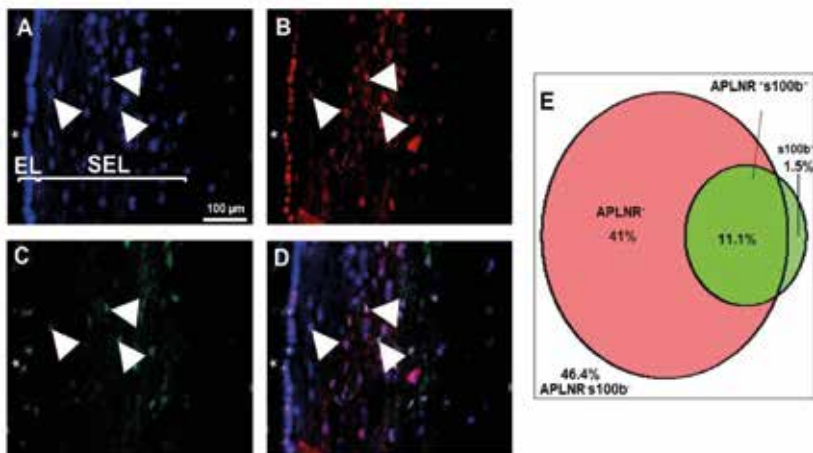
За да разберем дали APLNR се експресира в bona fide NSCs в суб-вентрикуларната зона при човека, ние направихме двойно имунохистохимично оцветяване за GFAP-delta и APLNR и открихме, че APLNR се експресира в GFAP-delta⁺ клетки и техните израстъци в астроцитната панделка (от англ. Astrocytic ribbon) (Фиг. 3.16.).



Фиг. 3.16: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (C) (червено) и GFAP-delta (B) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и GFAP-delta (E). Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, GFAPd⁺, APLNR⁺/GFAPd⁺ и APLNR-/GFAPd- от всички клетки.

Съвместното оцветяване за APLNR и GFAP δ , изоформа на GFAP, открита изключително в qNSCs, показва, че двойноположителните клетки са около 8% (95% интервал на доверителност 6.75–9.63%). В дорзо-вентралната ос има значително увеличение на това съотношение в средните области на вентрикула.

За да отдиференцираме невроналните стволови/прогениторни клетки от пост-митотичните паренхимни астроцити, използвахме калций-свързващия протеин s100b (Фиг. 3.17.). Нашите резултати показват, че в хипоцелуларната зона 11% (95% интервал на доверителност 9.58–2.02%) от всички APLNR⁺ клетки са двойноположителни, представляващи изместени епендимни клетки в сравнение с астроцитната панделка, където почти 25% от тях са съвместно маркирани за този маркер, съответстващ на зрели астроцити (95% интервал на доверителност 18.41–25.98%).

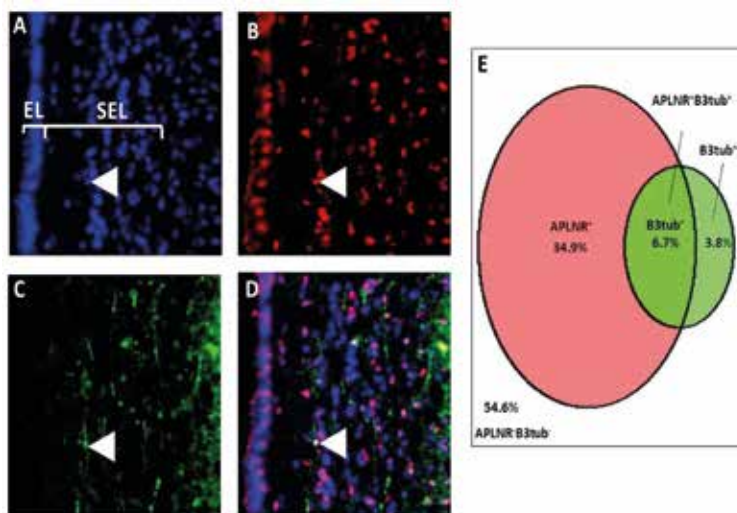


Фиг. 3.17: (А–Е) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено) и s100b (С) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глави на стрелки са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и s100b (Е). Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Iba1⁺, APLNR⁺/Iba1⁺ и APLNR⁻/Iba1⁻ от всички клетки.

В своя етап на развитие невроналните стволови/прогениторни клетки започват да се диференцират, превръщайки се първоначално в амплификационни клетки – вид бързо делящи се клетки, които от своя страна се диференцират в незрели неврони или невробласти. Невробластите мигрират по RMS до ОБ, където се диференцират в интерневрони. Невробластите могат да бъдат открити с помощта на антитяло, насочено срещу DCX (doublecortin) и β -III-tubulin. Клетъчни функции като мотилитет, миграция и митоза са свързани с правилното свързване и стабилизиране на микротубулите^{146,147}. Те се регулират от микротубул-асоциирани протеини като DCX. По време на процеса на невrogenеза DCX и β -III-tubulin участват в пролиферацията и миграцията на невробластите към ОБ.

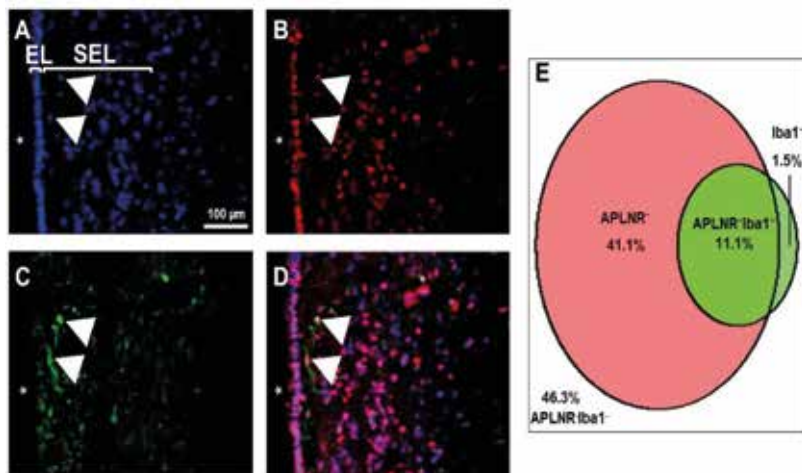
Двойни оцветявания бяха направени и с β -III-tubulin (Фиг. 3.18.). Статистиката показва, че в хипоцелуларната зона има намаление в дела

на двойноположителни клетки от всички APLNR⁺ клетки от дорзално към вентрално.



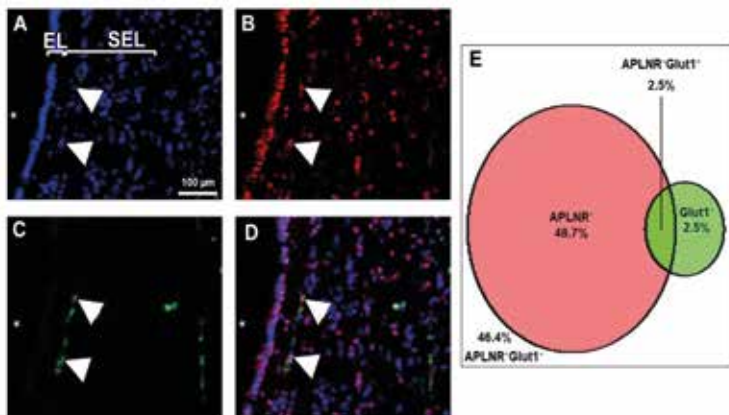
Фиг. 3.18 (A–D) Флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и β -III-tubulin (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и β -III-tubulin в SEL (D). Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, β 3tub⁺, APLNR⁺/ β 3tub⁺ и APLNR⁻/ β 3tub⁻ от всички клетки (E).

За да разберем дали микроглиалните клетки, които са основните фагоцитиращи клетки в мозъка, експресират APLNR, направихме двойно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване Iba1 и APLNR (Фиг. 3.19). Нашите резултати показват, че от всички APLNR⁺ клетки 41% от тях в хипоцелуларната зона са двойноположителни за Iba1 (95% интервал на доверителност 40.35–42.54%), в сравнение с астроцитната панделка, където те са 12% (95% интервал на доверителност 11.41–13.76%).



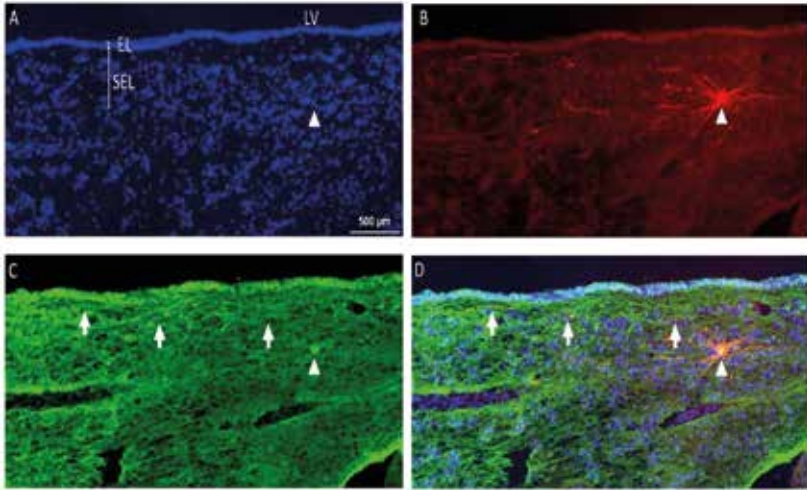
Фиг. 3.19: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и Iba1(C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и Iba1 в SEL (D). Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Iba1⁺, APLNR⁺/ Iba1⁺ и APLNR⁻/ Iba1⁻ от всички клетки (E).

За да разберем дали мозъчните ендотелни клетки експресират APLNR, направихме двойно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване GLUT1 и APLNR (Фиг. 3.20.). Резултатите ни показаха, че почти 5% от всички APLNR⁺ клетки са ендотелни клетки, положителни за GLUT1 както в гап зоната, така и в астроцитната панделка (95% интервал на доверителност 2.96– 6.51%).



Фиг. 3.20: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и Glut1(C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и Glut1 в SEL. (E) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Glut1⁺, APLNR⁺/ Glut1⁺ и APLNR⁻/ Glut1⁻ от всички клетки (E).

Апелинергичната система се състои от апелиновия рецептор и лиганда апелин, който го активира. Въз основа на този факт ние искахме да разберем дали сигналът за активация на рецептора, т.е. лигандът апелин, идва от цереброспиналната течност, или има клетки в SVZ, които го секретират. За тази цел направихме флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за APLN в комбинация с GFAP. Открихме единични клетки (≈ 1 клетка на коронарен срез, обхващащ целия вентрикул, която се намираше в SVZ и беше позитивна за GFAP). Също така забелязахме масивна арборизация на клетъчните израстъци, които или достигаха до кръвоносни съдове, или до някоя от зоните на SVZ (Фиг. 3.21.).



Фиг. 3.21: (A-D) Имунохистохимично оцветяване за APLN (B) (червено) и GFAP (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLN и GFAP в SEL, докато със стрелките са отбелязани израстъците на клетката, достигащи до кръвоносни съдове и епендима (D).

4. ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Индуциране на експресия на гени след глобална исхемия

Един от получените резултати показва завишена експресия на гени, експресирани в SVZ на възрастна маймуна след глобална исхемия. Нашето изследване се сведе до избор на гени, експресирани в различни части на SVZ, свързани или с локализацията на стволовите клетки в стволово-клетъчната ниша, или със сигнали, които те получават от нея (виж глава 6.1.). Степента на експресия беше потвърдена по два различни начина, което доказва правотата на резултатите. Нашите наблюдения показват, че клетките, съдържащи mRNA за TNC, APLNR, GJA1 и

CD38, са многократно завишени в субвентрикуларния слой. При всички гени наблюдавахме и засилена експресия в клетки, разположени около кръвоносните съдове. Различни фактори, преминаващи или през кръвоносните съдове, или през епендимните клетки от цереброспиналната течност, могат да имат определено влияние върху стволите или прогениторните клетки в SVZ.

4.2. Фенотипна характеристика на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 в нормален маймунски мозък

4.2.1. Фенотипна характеристика на TNC в нормален маймунски мозък

Представените до момента данни създадоха нужда от по-детайлен анализ на клетките, които експресират посочените гени. Комбинирайки GFAP, VIM и BrdU, които маркират различни групи от стволови и прогениторни клетки, ние успяхме да разграничим отделните субпопулации въз основа на наличието на гена на интерес в тях.

Tenascin-C е олигомерен екстрацелуларен протеин, съдържащ мономери, които в ЦНС се откриват около неврони и глия. Наличен е и в стволесто-клетъчни ниши (stem cell niches) като интестиналните крипти, костния мозък и космените фоликули. Също така неговото присъствие е описано при редица патологични състояния: туморни маси, възпаление, механични и химични травми, като експресията му се усилва при тъканно възстановяване^{153,154}. Като част от екстрацелуларния матрикс (ECM, extracellular matrix) Tenascin-C е пряко свързан с адхезията към други ECM протеини като фибронектин, интегрин, колаген, периостин, фибрилин-2 и други^{153,154}. Tenascin-C има възможност да активира EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), като по този начин стимулира клетъчната пролиферация. Tenascin-C може да бъде открит и в SVZ при гризачи, ограничен в SEL (subependymal layer, субепендимен слой) и RMS (rostral migratory stream, рострална миграционна система). В SVZ той може да бъде намерен в GFAP⁺ клетки, най-вероятно невронални стволести клетки, но отсъства в клетки, експресиращи маркери като PSA-NCAM (Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule), маркиращ

невробласти, и Ascl1 (Achaete-scute homolog 1), маркиращ транзиторни амплификационни клетки (TAPs, transit-amplifying progenitor cells)¹⁵⁶.

При обобщаване на резултатите от фенотипизацията могат да се изведат съответните заключения за характера на TNC⁺ клетки в SVZ при маймуна: те се експресират в голяма част от GFAP⁺ (qNSCs или aNSCs) клетки (32%) и VIM⁺ (aNSCs или TAPs) клетки (22%). Данните от тройното оцветяване GFAP/TNC/BrdU могат да бъдат интерпретирани по следния начин. Субпопулацията GFAP⁺/TNC⁺/BrdU⁺ вероятно представлява NSCs, които пролиферират (aNSCs = 2%), докато субпопулацията GFAP⁺/TNC⁺/BrdU е най-вероятно непролиферативни NSCs (qNSCs = 30%).

Поради характера на приложение на BrdU (5 дни и последваща евтаназия на животните), то следва да оцвети не само aNSCs, но и TAPs, които са силно пролиферативни (виж 5.10.). Поради наличието му както в GFAP⁺, така и VIM⁺ клетки и ниската експресия на гена в пролиферативни клетки ние смятаме, че TNC се експресира вероятно в субпопулация от qNSCs. qNSCs могат да бъдат подготвящи се за делене, т.нар. primed qNSCs, което е в съответствие с възможността на TNC да се свързва с EGFR и да активира пролиферацията. Трябва да се отбележи и възможната междувидова разлика между мишка и маймуна и вероятността за разлики в експресията и способността на TNC да се свързва и активира EGFR.

Сравнявайки експресионната характеристика на TNC при маймуна и тази при мишка¹⁵⁶, виждаме, че TNC се експресира от невронални стволови клетки, но за разлика от фенотипа при мишка, при маймуна TNC се експресира и от TAPs (TNC/Vim).

4.2.2. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален маймунски мозък

APLNR е G протеин-свързан рецептор от клас А (родопсин-подобен рецептор субклас А3, съдържащ 380 аа (amino acids, аминокиселини), с характерната 7-трансмембранна алфа-хеликсна структура^{157,158}.

APLNR е широко застъпен в животинското царство и се експресира в мишка, плъх, човек, маймуна и говеда. Описаните лиганди, способни да активират рецептора, са апелин-13, апелин-17, апелин-36, апелин-55 и Елабела (Elabela/Toddler)^{164,165}.

APLNR и APLN се откриват както в ЦНС, така и в ПНС.^{43,166-168} APLNR се открива в неврони, олигодендроцити и астроцити, но не и в микроглия, докато лигандът апелин се експресира от неврони, но не и астроцити¹⁶⁹⁻¹⁷³.

От получените фенотипни резултати могат да се изведат съответните заключения за характера на APLNR⁺ клетки в SVZ на маймунски мозък. Те се експресират в голяма част от GFAP⁺ (qNSCs или aNSCs) клетки (74%) и Vim⁺ (aNSCs или TAPs) клетки (40%). Само малка част от тях са пролиферативни (4%), като половината (59%) от пролифериращите клетки експресират гена. Тъй като GFAP се експресира от невронални стволови клетки, а Vim от невронални стволови клетки и TAPs, тройното оцветяване на APLNR с описаните два маркера показва наличие на 9.9% тройнопозитивни клетки за APLNR⁺GFAP⁺Vim⁺, от които позитивни за APLNR са 15%, представляващи вероятно субпопулация от aNSCs. Предвид, че GFAP маркира qNSCs и aNSCs, а Vim – aNSCs и TAPs, негативната за Vim субпопулация APLNR⁺GFAP⁺Vim⁻ ни дава информация за наличието qNSCs в 50% от клетките, експресирани APLNR, докато APLNR⁺GFAP⁻Vim⁺ ни дава информация за количеството TAPs (8%).

Приложението на BrdU само за 5 дни обуславя възможността да бъдат маркирани не само aNSCs, но и TAPs, които са силно пролиферативни (виж 5.10.). Данните от двойното оцветяване за APLNR/BrdU показват, че APLNR се експресира в минимална степен от aNSCs и TAPs (4%). Посочените резултати могат да бъдат интерпретирани по следния начин: тройнопозитивните APLNR⁺GFAP⁺Vim⁺ клетки са субпопулация от aNSCs (15%), тъй като GFAP се експресира в qNSCs и aNSCs, а Vim в aNSCs и TAPs. Субпопулацията от APLNR⁺GFAP⁺Vim⁻ (50%) представлява qNSCs поради липсата на Vim. Това демонстрира намаляване на експресията на APLNR в прехода qNSCs → aNSCs → TAPs (qNSCs = APLNR⁺GFAP⁺Vim⁻ (50%); aNSCs = APLNR⁺GFAP⁺Vim⁺ (15%); aNSCs/TAPs = APLNR/BrdU (4%); TAPs = APLNR⁺GFAP⁻Vim⁺ (8%).

Поради факта, че APLNR се експресира и в кръвоносни съдове, ние направихме двойно и тройно оцветяване с маркерите Vim и GLUT1. От получените резултати установихме, че 12% от всички клетки са двойнопозитивни за APLNR⁺GLUT1⁺, а 10.5% са тройнопозитивни за

APLNR⁺GLUT1⁺VIM⁺, което е в потвърждение на досегашните данни при гризачи за наличието на APLNR в кръвоносните съдове.

4.2.3. Фенотипна характеристика на GJA1 в нормален маймунски мозък

GJA1 (Connexin 43; Cx43) е протеин, който играе важна роля в междуклетъчната комуникация. GJA1 е трансмембранен протеин и се експресира в различни тъкани и органи, включително и в мозък. GJA1 се експресира както в ембрионалната, така и в адултната субвентрикуларна зона, където играе важна роля в поддържането на пролиферативните способности на NSCs. Повишена експресия на GJA1 е достатъчна, за да стимулира формирането на функционални екстрацелуларни канали, което е важно условие за поддържането и пролиферацията на NSCs. Също така нивата на GJA1 се понижават, когато NSCs започнат да се диференцират като неврони^{174,175}.

Нашите резултати показаха, че GJA1 се експресира както от GFAP⁺ (aNSCs или qNSCs) клетки (58%), така и от VIM⁺ (aNSCs или TAPs) клетки (16.4%). Методът на приложение на BrdU би маркирал само aNSCs или TAPs, като 4% от всички BrdU⁺ клетки са позитивни за GJA1. Резултатите ни показаха също, че по-малко от 1% са пролиферативни aNSCs, изследвани чрез тройно оцветяване за GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁺. Субпопулацията GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁺ би маркирала aNSCs (1.5% от GJA1), докато GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁻ би маркирала субпопулацията от qNSCs (57%). Това демонстрира факта, че GJA1 се експресира в голяма степен в qNSCs и в по-малка степен в aNSCs и TAPs.

Настоящите резултати са в единодушие със скорошни данни, показващи ролята на GJA1 в поддържането на пролиферацията и самовъзпроизвеждането на NSCs¹⁷⁶. Чрез оцветявания в комбинация с TNC допълнително открихме субпопулация от клетки TNC⁻GJA1⁺, която е негативна както за VIM, така и за BrdU, което демонстрира, че тези клетки са qNSCs.

4.2.4. Фенотипна характеристика на CD38 в нормален маймунски мозък

CD38 е 45 kDa трансмембранен гликопротеин, имащ както рецепторна, така и ензимно-медирана функция. Като рецептор CD38 взаи-

модейства със своя лиганд CD31¹⁷⁷. CD31, известен също като PECAM-1¹⁷⁷. Експресията на CD31 се наблюдава главно в ендотелните клетки, където се счита за конститутивен маркер, докато тази на CD38 се наблюдава почти във всички области на мозъка и се открива при статистически значимо по-високи от средните нива в *n. caudatus*, *pallidum*, *bulbus olfactorius*, *putamen* и *thalamus*. На клетъчно ниво CD38 се експресира в неврони, астроцити и микроглиални клетки в плъх и човек. В невроните CD38 се открива главно в перикариона, но също и в дендритите. На субклетъчно ниво в мозъка на мишката CD38 се намира най-вече на плазмената мембрана, но присъства и вътреклетъчно^{174,178,179}.

Фенотипната характеристика на CD38 показва, че генът се експресира от GFAP⁺ (62.8%) и от VIM⁺ клетки (23.5%), като малка част от CD38⁺ пролиферират (3.4%). С допълнителни оцветявания, които съчетават маркерите GFAP⁺VIM⁺CD38⁺, забелязахме, че част от клетките са тройнопозитивни GFAP⁺VIM⁺CD38⁺ (16%), но и че се отличава клетъчна фракция с фенотип GFAP⁺VIM⁻CD38⁺ (44%). Тези резултати показват, че тройнопозитивните GFAP⁺VIM⁺CD38⁺ клетки представляват aNSCs (16%), GFAP⁺VIM⁻CD38⁺ принадлежат към qNSCs (46%), докато GFAP⁻VIM⁺CD38⁺ са TAPs (7%). Това показва, че генът се експресира във високи количества в qNSCs (46%), след това спада при aNSCs (16%) и при TAPs (7%). Това демонстрира намаляване на експресията на CD38 в прехода qNSCs → aNSCs → TAPs (qNSCs = CD38⁺GFAP⁺VIM⁻ (46%); aNSCs = APLNR⁺GFAP⁺VIM⁺ (16%); aNSCs/TAPs = APLNR/BrdU (3.4%); TAPs = APLNR⁺GFAP⁻VIM (7%).

4.3. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален човешки мозък

APLNR се експресира и в човешки мозък. Поради факта, че от четирите избрани гени APLNR представлява най-лесният за фармакологично повлияване чрез лиганда апелин, използвахме нормални човешки мозъци, за да проучим наличието и фенотипа му в SVZ. APLNR се открива и в трите слоя на SVZ (епендимен слой, гап зона и субепендимен слой). В комбинация с различни маркери за стволови/прогениторни клетки открихме, че APLNR се експресира от GFAP⁺ клетки,

намиращи се в астроцитната панделка. Използвайки тройна комбинация APLNR/GFAP/Ki67, установихме, че повечето от APLNR⁺ клетки са активно пролифериращи (16 от 17 клетки), а само 2 са тройнопозитивни за GFAP/APLNR/Ki67. Наличието на малко Ki67⁺ клетки е в съответствие с предишни публикации^{28,38,45,46}. Пролифериращи епендимни клетки не бяха открити, което потвърждава факта, че те са пост-митотични¹⁴⁵. GFAP δ е изоформа на GFAP, експресираща се само в субпопулация от астроцити в SGZ (subgranular zone, субгрануларна зона на хипокампа), субпалиума и в астроцитната панделка на SVZ, като процесите им се намират в гап зоната^{26,33}. В допълнение, GFAP δ се експресира от пролифериращи клетки, маркирани с PCNA и BrdU и налични в невросфери (от англ. neurospheres) от адултен човешки мозък, т.е. те представляват бавно пролифериращи NSCs. От нашите резултати е видно, че APLNR се експресира и в GFAP δ ⁺ клетки. Видяхме също, че APLNR се експресира и от други клетъчни популации, свързани с различните стадии на неврогенеза (β -III-tubulin) или с клетки, асоциирани със стволово-клетъчната ниша (GLUT1, Iba1, s100b). 16% и съответно 18% от APLNR⁺ клетки са с неясен фенотип, вероятно представляващи TAPs. Беше показано, че апелин лигандът се експресира в субвентрикуларната зона, като клетките, експресиращи протеина, притежават множество дълги израстъци, вероятно стигащи до клетки, експресиращи APLNR, като по този начин ги активират. Допълнително трябва да бъдат изяснени механизъмът и значението на апелинергичната система в неврогенната ниша при хора.

4.4. Недостатъци на настоящото проучване

Важно е да се отбележат и някои от недостатъците на настоящото проучване.

На първо място, броят на използваните животни (*Macaca fuscata* = 3) и post-mortem мозъчни тъкани от хора (*Homo sapiens* = 3) е недостатъчен за изследване на популационно ниво, а само на индивидуално. Същото се отнася и за сравнителния анализ на ростро-каудалните нива при *Macaca fuscata*, *Mus musculus* и *Callithrix jacchus*, които бяха осъществени чрез използване на публична база данни, където мозъкът на едно животно е оцветен само за един ген, т.е. n = 1. Това обаче дава

важна насока за бъдещи проучвания, свързани с разпределението на неврални стволови клетки в бозайническия мозък.

По отношение на наличието на ростро-каудален градиент на пролиферативния маркер Ki67 бяха направени оцветявания само за него, без наличието на двойни и тройни оцветявания с други маркери. Това дава информация само за абсолютния брой на пролифериращите клетки в различните части на SVZ по ростро-каудалната ос, но не и за фенотипната характеристика на същите.

В настоящия момент в областта на изследвания на невrogenеза при бозайници се използват маркери, които могат да бележат повече от един вид клетъчни субпопулации. Например, с GFAP могат да бъдат белязани активирани неврални стволови клетки, неактивни неврални стволови клетки, както и паренхимни астроцити. Това твърдение е вярно и за други използвани в настоящата дисертация маркери като Vim и BrdU. При направените от нас фенотипни характеристики при възрастни макаци не беше използван маркер за отдиференциране на паренхимните астроцити при използването на антитела за GFAP и Vim. Дори и малката вероятност за наличието на паренхимни астроцити в SVZ при маймуни не изключва факта, че те могат да са оцветени и да представляват малка част от позитивните за тези два маркера клетки. Същото не се отнася за комбинациите Ген/GFAP/BrdU, тъй като паренхимните астроцити при нормални условия (такива без исхемия) не се делят. В бъдеще допълнителни тройни оцветявания GFAP/s100b/Ген и Vim/s100b/Ген биха дали по-добра представа за експресията на изследваните от нас гени в паренхимни астроцити поради факта, че s100b маркира именно тях. В допълнение, би било от полза да се изследва експресията на избраните гени в комбинация с относително специфични маркери, експресирани в невробласти и TAPs, като DCX, β -III-tubulin и респективно EGFR.

Беше установено различно количество на експресия на GFAP и Vim в ростро-каудалната ос. Това означава, че клетъчните субпопулации, маркирани с тези два маркера (aNSCs, qNSCs, TAPs), са с различно разположение по ростро-каудалната ос и притежават различни функции. Би било от полза следващи проучвания да направят по-детайлна характеристика на фенотипа на различните избрани от нас гени по ростро-каудалната ос.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ние представяме първото детайлно изследване, показващо повишената експресия на гените TNC, APLNR, GJA1, CD38 след глобална исхемия в най-голямата неврогенна ниша при бозайници. В допълнение показваме характеристиката на ростро-каудалната им експресия във венрикула на нормална маймуна, която беше количествено сравнена и при различни бозайници. За да разберем характера на клетките, експресиращи избраните от нас гени, направихме фенотипна характеристика с известни стволоро-клетъчни маркери. Нашите резултати показват, че в нормална маймуна гените вероятно се експресират в невронални стволоро-клетки в различни етапи на тяхната диференциация. Открита е и комбинация от маркери, специфична за неделящи се невронални стволоро-клетки (TNC-GJA1⁺). Поради възможността за фармакологично повлияване на APLNR беше направена и подробна имунохистохимична характеристика на клетките, експресиращи APLNR в субвенрикуларната зона на възрастни хора без наличие на неврологични и психиатрични заболявания. Резултатите ни показват, че APLNR се експресира както във всички етапи от диференциацията на невроналните стволоро-клетки, така и в клетки, асоциирани с неврогенната ниша. Доказано е и наличието на апелин лиганд в SVZ на хора без патология.

Бъдещи изследвания трябва да разкрият ролята и значението на TNC, CD38 и GJA1 в бозайническата неврогенеза. Голямо значение би имало изясняването на транскриптома на различни ростро-каудални нива при примати. Не на последно място, бъдещи изследвания трябва да проучат молекулните механизми за ролята на APLNR в стволоро-клетъчната биология и възможното приложение на лигандите му за терапии на заболявания на ЦНС, протичащи с невронална смърт и увеличаване на неврогенността и/или диференциацията в SVZ.

6. ИЗВОДИ

1. Глобалната мозъчна исхемия предизвиква значимо увеличаване на генната експресия на APLNR, CD38, TNC и GJA1 в SVZ при възрастни макаци.
2. Експресията в SVZ на APLNR, CD38, TNC и GJA1 по rostro-каудалната ос при възрастни макаци е различна.
3. Градиентите на експресия на APLNR, CD38, TNC и GJA1 в rostro-каудалната ос показват междувидови различия.
4. В SVZ на примати в нормални условия генът TNC маркира субпопулация от неврални стволони клетки.
5. При нормална маймуна APLNR вероятно се експресира от „спящи“ невронални стволони клетки, като експресията намалява с диференциацията.
6. При нормална маймуна GJA1 вероятно се експресира от „спящи“ невронални стволони клетки, като експресията намалява с диференциацията.
7. Клетъчната субпопулация от TNC-GJA1+ е специфична комбинация за откриване на „спящи“ невронални стволони клетки.
8. При нормална маймуна CD38 вероятно се експресира от „спящи“ невронални стволони клетки, като експресията намалява с диференциацията.
9. При хора APLNR се експресира в различни етапи от диференциацията на невроналните стволони клетки, както и от клетките, асоциирани с неврогенната ниша.
10. Апелин лигандът се експресира от глиални/невронални клетки в SVZ на хора при липса на патология.

7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път се установява увеличена експресия на гените TNC, APLNR, GJA1 и CD38 в приматен модел на глобална мозъчна исхемия.
2. За първи път се описва ростро-каудалната експресия на TNC, APLNR, GJA1 и CD38 в нормална маймуна.
3. За първи път се демонстрират разлики в ростро-каудалната експресия на TNC, APLNR, GJA1 и CD38 при три различни бо-зайника.
4. За първи път се документираща детайлно фенотипната характеристика в SVZ на TNC, APLNR, GJA1 и CD38 в нормална маймуна.
5. За първи път се изяснява детайлната фенотипна характеристика на APLNR в SVZ на хора без патология.

8. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДОКТОРАНТУРАТА

- 8.1. Stoyanov, D.S.; *Ivanov, M.N.*; Yamashima, T.; Tonchev, A.B. Expression of Transcription Factor ZBTB20 in the Adult Primate Neurogenic Niche under Physiological Conditions or after Ischemia. *Genes* **2022**, *13*, 1559. <https://doi.org/10.3390/genes13091559>
- 8.2. *Ivanov, M.N.*; Pavlov, S.S. Distribution and expression of Apelin/APJ system in the mammalian body- a review. *BMR* 2023, *32*, xx-xx

9. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

aa	Amino acids residues
ADPRP	adenosine-5'-O-diphosphoribose
aNSC	activated NSC
AP	Alkalane phosphatase
APLN	Apelin ligand
APLNR	Apelin receptor
Ascl1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
ATP	Adenosine triphosphate
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BrdU	Bromodeoxyuridine
CD38	Cluster of differentiation 38
cDNA	Comple
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CXC24	Chemokines 24
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCX	Doublecortin
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EL	Ependymal layer
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FICH	Fluorescent immunohistochemistry
FISH	Fluorescent in situ hybridisation
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GJA1	Gap Junction Protein Alpha 1
GLAST	Glutamate aspartate Transporter
Glut1	Glucose transporter 1
i.m.	intramuscular injection
i.v.	Intravenous
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IHC	Immunohistochemistry

ISH	In situ hybridisation
kDA	Kilodalton
Ki67	Marker of proliferation Kiel 67
Kif2A	Kinesin Family Member 2A
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MAX	MYC Associated Factor X
MCA	Middle cerebral artery
MCM2	Minichromosome Maintenance Complex Component 2
mRNA	Messenger RNA
NAADP	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NPC	Neural progenitor cell
O.C.T.	Optimal cutting temperature compound
OB	Olfactory bulb
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PK	Proteinase K Buffer
Prom1	Prominin-1
PSA-NCAM	Polysialylated-neural cell adhesion molecule
PVSVZ	Perivascular subventricular zone
qNSC	Quiescent Neuronal stem cell
RNA	Ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
Roi	Region of interest
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCD5	Stearoyl-CoA desaturase 5
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SEL	Subependymal layer
SGZ	Subgranular zone
STR	Striatum
SVZ	Subventricular zone
TAPs	Transient Amplification Progenitors
TNC	Tenascin c

tRNA	Transport ribonucleic acid
TUC4	Turned On After Division
Tuj1	III beta-tubulin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
Wnt	Wingless
ZBTB20	Zinc Finger And BTB Domain Containing 20

10. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на моя научен ръководител **доц. Павлов** за подкрепата и насоките, които ми оказа, за безкрайните отговори на безкрайните ми въпроси.

Благодаря на **проф. Тончев** за помощта, която ми оказа, за доверието и подкрепата! Благодаря за безкрайното търпение.

На **Димо, Лора** и **Андон** за часовете обсъждане, спорене и приятелската атмосфера.

Благодаря на лаборантите **Велина Кеновска**, **Елена Боева**, **Неранза Колева** и **Габриела Димитрова** за проявените отговорност и прецизност при изготвянето на хистологичните препарати.

Благодаря на препараторите **Лилия Даскалова** и **Диляна Димитрова** за помощта, оказана при воденето на дирекционните упражнения.

Благодаря на колегите от катедрата по „Анатомия и клетъчна биология“ за прекрасната работна среда и морална подкрепа.

Благодаря на колегите от административния отдел **Галина Ангелова** и **Ива Даскалова** за добрата организация и безпроблемното протичане на семейството.

Най-вече на голямото ми **семейството** за помощта, подкрепата, вярата в мен. Благодаря им, че бяха до мен дори и когато мен ме нямаше или тялом, или духом.