



Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна

Факултет по медицина
Катедра по обща и клинична патология,
съдебна медицина и деонтология

Д-р Виктория Детелинова Михайлова

ПРОМЕНИ В ГЛИАЛНИ ПОПУЛАЦИИ НА ЧОВЕШКИ ТЕЛЕНЦЕФАЛОН СЛЕД ИСХЕМИЧНА УВРЕДА

АВТОРЕФЕРАТ

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

Направление: 7.1 Медицина

Докторска програма: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:

доц. д-р Ирина И. Стоянова – ван дер Лаан, д.м.

Варна, 2024 г.

Дисертационният труд е оформен върху 158 стандартни машинописни страници. Литературният обзор е подкрепен от 4 фигури и 2 таблици. Материали и методи са подкрепени от 1 фигура и 4 таблици. Резултатите са подкрепени от 40 фигури. Обсъждането е подкрепено от 4 фигури. Цитирани са 358 литературни източника, от които всички са на латиница.

Външни членове на журито:

1. Проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н.
2. Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, д.м.
3. Проф. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, д.м.

Вътрешни членове на журито:

1. Доц. д-р Деян Людмилов Дженков, д.м.
2. Доц. д-р Ирина Иванова Стоянова-ван дер Лаан, д.м.

Резервен външен член на журито:

Проф. д-р Веселин Тодоров Беловежов, д.м.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 23. 07. 2024 г. от 13.30 в електронна платформа Webex на открито заседание на научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ – Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
1. УВОД	6
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	11
3.1. Цел.....	11
3.2. Задачи.....	11
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	12
4.1. Човешки мозъчни тъкани.....	12
4.2. Обработка на тъканите.....	18
4.3. Имунохистохимични оцветявания	18
4.4. Дигитализиране на микроскопските препарати	21
4.5. Анализ на оцветяванията.....	22
4.6. Статистика.....	23
5. РЕЗУЛТАТИ	24
5.1. Морфологичен анализ на постисхемични човешки мозъчни тъкани	24
5.2. Количество и разпределение на ZBTB20-позитивните клетки ..	25
5.3. Експресия на ТФ ZBTB20 – флуоресцентна имунохистохимия	30
5.4. Маркер за неврони	31
5.5. Маркери за астроцити	32
5.6. Съдов маркер.....	36
5.7. Маркер за олигодендроцити	36
5.8. Постисхемични тъкани – обобщен статистически анализ	40
5.9. Маркер за микроглия	42
6. ОБСЪЖДАНЕ	43
6.1. ТФ ZBTB20 се експресира в сиво и в бяло мозъчно веще- ство на човек при физиологични условия и след исхемична увреда.....	43

6.2.	Сравнителен количествен анализ на експресията на ТФ ZBTB20 в контролни и в постисхемични мозъчни тъкани.	43
6.3.	Фенотип на ZBTB20-позитивните клетки в мозъчни тъкани при физиологични условия и след исхемична увреда.	45
6.4.	Класификация на периневронална сателитна глия	50
6.5.	Влияние на различни параметри върху експресията на ТФ ZBTB20 в човешки постисхемични мозъчни тъкани	51
6.6.	Макроглиални клетъчни субпопулации – плеоморфизъм и комплексност.	52
6.7.	Технически трудности при анализ на препарати с инфаркт на мозъчната тъкан	52
7.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
8.	ИЗВОДИ	55
9.	СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 56	
9.1.	Оригинални резултати	56
9.2.	Потвърдителни резултати	56
10.	ПУБЛИКАЦИИ, ДОКЛАДИ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	57
10.1.	Публикации	57
10.2.	Научни доклади.	57
10.3.	Научни проекти.	58
11.	БЛАГОДАРНОСТИ	59

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

БМВ	бяло мозъчно вещество
ДСМА	дясна средна мозъчна артерия
КЕНИ	Комисия по етика на научните изследвания
КМБ	кръвно-мозъчна бариера
ЛСМА	лява средна мозъчна артерия
ПМИ	постмортален интервал
СМВ	сиво мозъчно вещество
СТ	стайна температура
ТФ	транскрипционен фактор
GFAP	(от англ.език <i>glial fibrillary acidic protein</i>) - глиален фибрилелен кисел протеин
IBA1	(от англ.език <i>ionised calcium-binding adapter molecule 1</i>) – йонизирана, свързваща калций адаптерна молекула 1
MHC I и II	(от англ.език <i>major histocompatibility complex class I и II</i>) – главен комплекс на тъканна съвместимост I и II
NeuN	(от англ.език <i>neuronal nuclear antigen</i>) – невронален ядрен антиген
NG2	(от англ.език <i>neuron-glia antigen 2</i>) –невроглиален антиген 2, протеогликан
NSPCs	(от англ.език <i>neural-sphere-producing cells</i>) - невронални клетки, образуващи сфери
ROI	(от англ. език <i>region of interest</i>) – регион на интерес
OL	(от англ. език <i>oligodendroglial</i>) – олигодендроглиален/а/и-
OLs	(от англ.език <i>oligodendrocytes</i>) – олигодендроцити
OPCs	(от англ.език <i>oligodendrocyte precursor cells</i>) - олигодендроцитни прогениторни клетки
SOX10	от англ.език <i>SRY-related HMG box 10</i>
ZBTB20	(от англ.език <i>zinc finger and BTB domain containing transcriptional factor</i>) – транскрипционен фактор, съдържащ цинков пръстен и BTB домейн

1.УВОД

Нараства интересът към глиалните клетки в централната нервна система (ЦНС) поради тяхната важна роля за поддържането на хомеостазата в мозъчната тъкан при физиологични условия и след увреда. Натрупано е значително количество доказателства относно тяхната способност да оказват както инфламаторен, така и противовъзпалителен ефект при различни патологични състояния. В комбинация с техния потенциал за пролиферация те спомагат не само за ограничаване на уврежданията на мозъка и пренареждане на тъканта, но и за възстановяване на невроните и синаптичната регенерация. Освен това реактивните глиални клетки могат да модулират процесите на неврогенеза, диференциация на невроните и миграцията им във вече съществуващите неврални вериги във възрастния мозък. Чрез откриването на молекулярни сигнали и механизми в определени неврологични ниши могат да се наложат стратегии, които да стимулират генерирането на функционални неврони. Тези познания ще намерят приложение при повлияване на налично мозъчно увреждане или при модулиране на дегенеративни неврологични състояния.

Исхемичната мозъчна увреда представлява състояние, което възниква, когато доставката на кръв към определени участъци от мозъка е намалена или прекъсната. Този процес може да бъде причинен от различни фактори, включително обструкция на кръвоносните съдове, които кръвоснабдяват мозъка, или намалена кръвна циркулация. В зависимост от етиологията и механизмите на възникване мозъчната исхемия може да се класифицира в няколко основни вида. Исхемичният мозъчен инсулт е една от основните клинични прояви на мозъчна исхемия и е една от водещите причини за хронични увреждания, инвалидност и смъртност в световен мащаб.

Изучаването на глиалната клетъчна пластичност и сложните междуклетъчни взаимодействия в ЦНС са предимно базирани на изследвания, проведени върху опитни животни при стриктно спазване на етични стандарти и грижи за благосъстоянието на животните. Този подход предоставя възможност за контролирано и експериментално изследване на мозъчната функция и заболявания. Гризачите (мишки) са често използвани поради тяхната генетична податливост и лесността за ге-

нетично модифициране. Маймуните са по-близки до човешкия мозък и се използват в по-сложни експерименти. При изучаването на мозъчната тъкан при хора научният подход обикновено включва използването на различни експериментални модели: мозъчни биопсии, взети по време на хирургични процедури; функционални магнитно-резонансни изследвания; изследвания на мозъчната тъкан постмортем; клинични проучвания с пациенти, включващи например изследвания с електроенцефалография или позитронна емисионна томография. Тези методи предоставят ценна информация, но имат ограничено приложение и не могат напълно да заменят изследването на мозъчната тъкан в контролирана лабораторна среда. Поради тази причина резултатите от тях, получени до момента, остават непълни и понякога двусмислени. Въпреки това, те служат като стабилна основа за разработването на стратегии, насочени към повлияване процеса на възстановяване на постисхемичната мозъчна тъкан.

Настоящият дисертационен труд ще разгледа важната роля на глияните клетки в човешкия мозък след исхемична увреда, предоставяйки по-детайлен поглед върху техните молекулярни и клетъчни отговори на исхемия, както и влиянието, което оказват върху хода на заболяването.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Мозъчният инсулт е клиничната проява на инфаркт на мозъчната тъкан. Церебралният инфаркт е най-често причинен от исхемия (исхемична хипоксия или още стагнантна хипоксия), може да бъде също така и резултат от редуцирано количество кислород в кръвта без редукция на мозъчното кръвообращение (хипоксия или анемична хипоксия) или резултат от токсини, които възпрепятстват клетките да използват кислород за окислителни процеси (хистотоксична хипоксия). Освен на кислороден недостиг мозъчната тъкан е много чувствителна и на недостиг на глюкоза (хипогликемия) (Love 2011).

„Реактивната астроглиоза“ е термин, с който се означават клетъчни, функционални и молекулярни промени, които астроцитите претърпяват след увреда (Bardehle et al. 2013). Астроцитната реактивност може да бъде характеризирана като лека, умерена, дифузна или тежка. Пролиферацията на A1 клетъчния подтип реактивни астроцити води до невронална и OL смърт. A2 реактивните астроцити имат невропротективен ефект и отделят трофични за невроните фактори (Liddelw et al. 2017). Промените в астроцитната морфология могат да бъдат описани според стадия на мозъчния инфаркт. Различията в реактивността на астроцитите се свързват с тяхната чувствителност към исхемия, разположението им спрямо ядрото на лезията, както и с техните подтипове (Shannon, Salter, and Fern 2007).

Съществува хипотеза, че реактивните астроцити, образуващи цикатрикс, са всъщност астроцитоподобни NSCs, диференциращи се в астроцити, и че тази трансформация е модулирана от специфични гени, активирани след исхемия. Реактивни астроцити, изолирани от перинфарктна крайномозъчна кора след исхемия, могат да се де-диференцират до невронални клетки, образуващи сфери (от англ. език neural-sphere-producing cells, NSPCs). При трансплантиране на такъв вид клетки обаче е показано, че те могат да се диференцират в астроцити и OLs, но не и в неврони. Съвременни проучвания сочат, че реактивните астроцитни глиални клетки след исхемия могат да бъдат репрограмирани във функциониращи неврони, което е свързано с редуциране на огнището на глиоза и възстановяване на синаптични контакти. Също така има данни, че комбинация от транскрипционни фактори може да трансформира ре-

активните астроцити не само в неврони, но и в невробласти (Qian et al. 2020, He, Yang, and Zhang 2022, Chiareli et al. 2021, Alhadidi et al. 2023).

OLs са много чувствителни на исхемия и само три часа след острия инцидент голям брой от тях загиват. В същото време те имат съществена роля при хроничния стадий на исхемията, тъй като са основната клетъчна популация, отговорна за ремиелинизацията на засегнатите аксони (Zhang and Chopp 2009). OLs нямат капацитет за самовъзобновяване. Исхемията стимулира пролиферацията и диференциацията на OPCs в миелинизиращи OLs (Zhang, Chopp, and Zhang 2013).

Заедно с макрофагите NG2-глиалните клетки са идентифицирани в рамките на първия ден след появата на увреда (Bardehle et al. 2013). Това предполага, че NG2-глията изпълнява регулаторна функция и поддържат хомеостатичното равновесие след увреда (Bedner, Jabs, and Steinhauser 2020).

След локална мозъчна исхемия се установяват различни микроглиални фенотипове в зависимост от разположението на микроглията спрямо огнището на увреда и специфичната експресия на повърхностни клетъчни протеини (Xu et al. 2020). Докато активираната микроглия в зоната на инфаркт има фагоцитарна активност и експресира основно MHC I (от англ. език major histocompatibility complex class I) (Stoll, Jander, and Schroeter 1998), то микроглията в отдалечените от лезията региона експресира MHC II и има отношение към невроналната дегенерация (Block, Dihne, and Loos 2005). Микроглията може да участва в реконструкцията на кръвоносните съдове след исхемия (Moon et al. 2021). Според редица проучвания исхемията стимулира неврогенеза както при гризачи (Stoyanova et al. 2022), така и при примати (Tonchev 2011). В ипсилатералната SVZ активираната микроглия с клетъчни израстъци подпомага миграцията на невроналните прекурсорни клетки, докато амебовидната микроглия в перинфарктната зона може да оказва неблагоприятен ефект върху неврогенезата (Thored et al. 2009). Функцията на невроналните вериги след исхемия може също да бъде повлияна от микроглията (Haslund-Vinding et al. 2017). Активираната микроглия изпълнява своята функция както в острата, така и в подострата и хроничната фаза на мозъчен инфаркт (Xu et al. 2020).

По-долу са изброени ТФ, които имат пряко отношение към настоящия експеримент и са представени за пръв път в контекста на исхемична мозъчна увреда при човек.

ТФ SOX10 регулира диференциацията на OLs и се експресира в цялата олигодендроцитна клетъчна линия, от OPCs до зрели OLs, както по време на ембрионалното развитие, така и в мозъчната тъкан на възрастни. Колкото по-зряла е клетката, толкова по-интензивно експресира Sox10. Също така, влизайки във взаимодействие с фактори, отговорни за астроцитната диференциация, *SOX10* може да я инхибира. Следователно това е фактор, който определя съдбата не само на OPCs и техните потомци, а също така и на астроцитите (Sock and Wegner 2021). Известно е, че *in vivo SOX10* може да трансформира зрели астроцити в подобни на OPCs клетки, които имат олигодендроглиален фенотип. В допълнение, при патологични условия диференцираните OLs могат да се трансдиференцират в астроцити обратно (Mokhtarzadeh Khanghahi et al. 2018). Значението на *Sox10* при исхемична мозъчна увреда се предполага, че е свързано пряко със засягането на невроналната функция в следствие от хипоксията (Pingault et al. 2022).

ZBTB20 представлява ДНК молекула – репресор и е с ключова роля като регулатор на генната експресия по време на невроналното развитие и функциониране. През ембрионалния период при мишка *Zbtb20*-позитивни са прогениторните клетки, участващи в процесите на астроцитогенеза и олигодендроцитогенеза (Nagao et al. 2016, Doeppner, Herz, Bähr, et al. 2019), и е доказано е, че *Zbtb20* е основен регулатор на развитието на астроцитите. Влиянието на *Zbtb20* върху процесите на неврогенеза и глиогенеза е изследвано в мозък на мишки. Резултати от експериментални постановки подкрепят хипотезата, че *Zbtb20* е регулатор на реактивната астроглиоза при патологични състояния, в това число и след мозъчна исхемия (Nagao et al. 2016, Doeppner, Herz, Bähr, et al. 2019). В допълнение, при проучване от 2016 г. *ZBTB20* генът е посочен като рисков и с принос за развитието на исхемичен мозъчен инсулт (Soderholm et al. 2016).

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1. Цел

- Да се изследва експресията на ZBTB20 в глиалните клетки на човешки краен мозък и да се установи ефектът на исхемичната мозъчна увреда върху експресията на ZBTB20.

3.2. Задачи

- Преданалитична подготовка на материалите за изследване: колекция и подбор на некропсични блокчета от мозъчна тъкан от починали пациенти без данни за неврологично заболяване и от починали с данни за мозъчен инфаркт.
- Изработване на микроскопски срези от подобрите парафинови блокчета, депарафиниране на мозъчната тъкан и прилагане на имунохистохимични оцветявания (пероксидазна имунохистохимия и имунофлуоресцентна хистохимия).
- Сканиране на микроскопските препарати и анализ на получените дигитални изображения.
- Определяне количеството, локализацията, разпределението и фенотипа на клетките, експресиращи ТФ ZBTB20 в човешки мозъчни тъкани без и с исхемична увреда.
- Определяне на фракцията ZBTB20-позитивни клетки от общия брой клетки в изследваните срези.
- Сравнителен количествен анализ на експресията на ZBTB20 в мозъчни тъкани без исхемична увреда и в постисхемични мозъчни тъкани.
- Отчитане влиянието на специфични параметри върху експресията на ZBTB20 в постисхемичните мозъчни тъкани.
- Статистически анализ на получените данни.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Човешки мозъчни тъкани

Всички експериментални процедури бяха извършени след одобрение и в съответствие с правилата на Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна с протокол/решение №115 от заседание на 31.03.2022 г. Обект на изследването бяха мозъчни тъкани от починали хоспитализирани пациенти, събрани по време на аутопсии, извършени на територията на Клиниката по обща и клинична патология към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Медицинската документация на пациентите беше използвана за получаване на информация относно техния пол, възраст, интервал от време между момента на настъпването на смъртта и момента на извършване на аутопсията (постмортален интервал, ПМИ – до 24 часа), клинични симптоми и прояви, наличие или липса на придружаващи заболявания, данни от образни изследвания с радиографско описание на исхемичните лезии, продължителност на живота на пациента от момента на постъпване в болница до момента на смъртта, както и причината за настъпилата смърт. От аутопсионните протоколи бе получена информация относно локализацията на исхемичната лезия, размер, засегнатата територия на кръвоснабдяване, макроскопско описание, както и допълнителна информация за състоянието на пациента на базата на другите аутопсионни находки. Случаите бяха подбрани ретроспективно за период от две години: 12 случая без хистологични или радиографски данни за мозъчна увреда (контролна група) и 12 случая с клинични и образни данни за прекаран исхемичен мозъчен инсулт. Във всяка група бяха представени и двата пола: 9 мъже и 3 жени от контролната група пациенти и 7 мъже и 5 жени от случаите с исхемична мозъчна увреда. Възрастта на пациентите беше между 45 г. и 83 г. (средна възраст на всяка група поотделно, както и на общия брой пациенти – 68 години).

Мозъчните тъкани на пациенти без налични неврологични заболявания бяха взети от областта на моторната крайномозъчна кора (Gyrus precentralis), като включваха СМВ и прилежащото към него БМВ (Таб. 4.1.)

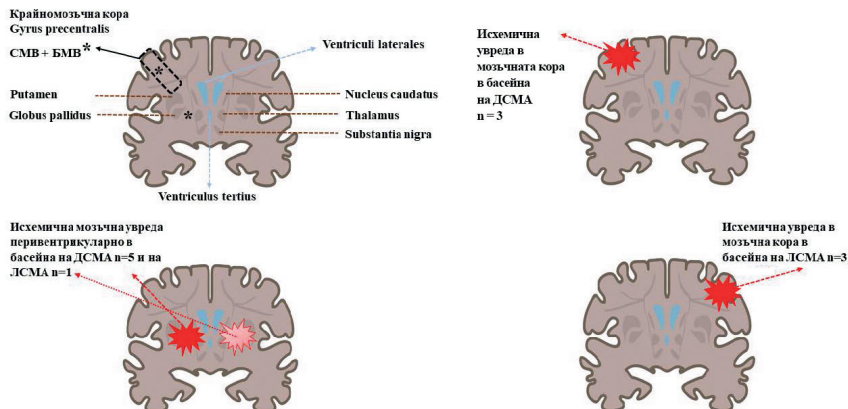
Таблица 4.1. Информация за случаите без исхемична мозъчна увреда (контроли)

Пол	Годи-ни	ПМИ	Регион на интерес	Патологоанатомична диагноза
М	67 г.	11 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Умеренодиференциран плоскоклетъчен карцином на десен главен бронх, хронична обструктивна белодробна болест, остра сърдечна и дихателна недостатъчност
М	73 г.	17 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Счупване на бедрена шийка в дясно, масивна белодробна тромбоемболия, остра дихателна и сърдечна недостатъчност
М	45 г.	6 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Дилатативна кардиомиопатия, хронична обострена сърдечна недостатъчност
М	68 г.	18 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Исхемична болест на сърцето, хронична обструктивна белодробна болест, хронична обострена сърдечна недостатъчност
М	72 г.	14 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Исхемична болест на сърцето, уротелен карцином на пикочен мехур, хронична обострена сърдечна недостатъчност
М	49 г.	7 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Инфаркт на миокарда, остра сърдечна недостатъчност
М	63 г.	13 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Исхемична болест на сърцето, хипертонична болест, остра сърдечна недостатъчност
М	71 г.	16 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis)	Дълбока венозна тромбоза, масивна меболодробна тромбоемболия, остра сърдечна и дихателна недостатъчност

Пол	Годи-ни	ПМИ	Регион на интерес	Патологоанатомична диагноза
Ж	77 г.	15 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gurus precentralis)	Двустранна гнойнонекротизираща бронхопневмония, хронична обострена сърдечна недостатъчност, остра дихателна недостатъчност
Ж	83 г.	8 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gurus precentralis)	Исхемична болест на сърцето, руптурирала аневризма на аортата, сърдечна тампонада, хронична обострена сърдечна недостатъчност
М	66 г.	13 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gurus precentralis)	Локално авансирал кератинизиращ плоскоклетъчен карцином на ларинкс, хипертонична болест, хронична обострена левостранна сърдечна недостатъчност
Ж	79 г.	10 ч.	Моторна крайномозъчна кора (gurus precentralis)	Хронична исхемична болест на сърцето, хронична обострена двустранна сърдечна недостатъчност

* ПМИ – постмортален интервал, М – мъж, Ж – жена, г. – години, ч. – часове след настъпване на смъртта

В препаратите с мозъчен инфаркт лезиите бяха наблюдавани в две области: перивентрикулярно и в областта на крайномозъчната кора, като при отделните случаи бяха засегнати СМВ и БМВ (Фиг. 4.1.).



Фигура 4.1. Схематично представяне на локализацията на мозъчен инфаркт в представителната извадка. Правоъгълното очертание на първото изображение демонстрира един регион на интерес от човешка крайномозъчна кора (gyrus precentralis) от контролните случаи, който включва сиво мозъчно вещество (СМВ, тъмнокафяво) и подкорово бяло мозъчно вещество (БМВ, светлокафяво). Участъци от БМВ са означени чрез знака *. Със син цвят се вижда мозъчната вентрикулна система. С пунктирни линии са нанесени означения на мозъчни структури и техните латински наименования. Областта на тъканна увреда в изследваните случаи е илюстрирана на другите три изображения чрез червена звезда и обхваща СМВ и БМВ в басейна на дясната средна мозъчна артерия (ДСМА) и на лявата средна мозъчна артерия (ЛСМА). Анализирани са общо 6 случая с мозъчен инфаркт в областта на мозъчната кора и 6 случая с перивентрикулярна локализация на мозъчния инфаркт

Изследваните тъкани бяха групирани според давността на исхемичната увреда. Първата група включваше т.нар. остър стадий на исхемия ($n = 1$ пациент). Втората група включваше т.нар. стадий на организация, който се подразделя на остра фаза ($n = 2$ пациенти) и хронична фаза ($n = 7$ пациенти). Третата група включваше случаи, които са в т.нар. стадий на резорбция ($n = 2$ пациенти). В някои от случаите исхемичната лезия бе придружена и от хеморагична компонента ($n = 2$ пациенти) (Табл. 4.2.).

Таблица 4.2. Информация за случаите с исхемична мозъчна увреда

Пол	Години	ПМИ	Локализация на исхемична увреда	Стадий на мозъчния инфаркт	Патологоанатомична диагноза
Ж	79 г.	24 ч.	Крайномозъчна кора	III-ти стадий	Корова енцефаломалация в лява голямомозъчна хемисфера с тенденция към формиране на псевдокиста
М	67 г.	24 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	II-ри стадий, остра фаза	Исхемичен мозъчен инфаркт с паристална перивентрикуларна локализация в дясна голямомозъчна хемисфера
М	66 г.	6 ч.	Крайномозъчна кора	II-ри стадий, хронична фаза	Корова енцефаломалация в дясно окципитално
Ж	70 г.	13 ч.	Крайномозъчна кора	I-ви стадий	Бяло мозъчно размекчение в париеоокципиталната област на дясна голямомозъчна хемисфера
М	71 г.	10 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	III-ти стадий + хеморагична компонента	Хеморагичен мозъчен инфаркт в дясна голямомозъчна хемисфера, перивентрикуларно
Ж	76 г.	6 ч. 30 мин.	Крайномозъчна кора	II-ри стадий, хронична фаза	Енцефаломалация в дясна голямомозъчна хемисфера
Ж	69 г.	12 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	II-ри стадий, остра фаза + хеморагична компонента	Паренхимна хеморагия в дясна голямомозъчна хемисфера с пробив в мозъчните стомахчета

Пол	Години	ПМИ	Локализация на исхемична увреда	Стадий на мозъчния инфаркт	Патологоанатомична диагноза
М	70 г.	6 ч.	Крайномозъчна кора	II-ри стадий, хронична фаза	Енцефаломалация в лява голямомозъчна хемисфера на нивото на 2-ри до 5-ти срез
М	53 г.	20 ч.	Крайномозъчна кора	II-ри стадий, хронична фаза	Енцефаломалация в лява голямомозъчна хемисфера от 3-ти до 5-ти срез
М	65 г.	24 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	II-ри стадий, хронична фаза	Енцефаломалатични огнища в дясна голямомозъчна хемисфера
Ж	72 г.	23 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	II-ри стадий, хронична фаза	Бяло мозъчно размекчение в лява голямомозъчна хемисфера от 3-ти до 6-ти срез
М	59 г.	22 ч.	Перивентрикуларно БМВ + базални ганглии	II-ри стадий, хронична фаза	Исхемичен тромбоемболичен мозъчен инфаркт в басейна на ДСМА

* ПМИ – постмортал интервал, М - мъж, Ж – жена, г. – години, ч. – часове след настъпване на смъртта, БМВ – бяло мозъчно вещество

4.2. Обработка на тъканите

Тъй като тъканите, обект на изследване, представляват архивен некропсичен материал ($n=24$ парафинови блокчета), те бяха предварително обработени според стандартна хистологична техника: фиксация в 10% буфериран неутрален формалин, включване в парафин, рязане с дебелина на срезите 3–5 μm и оцветяване с хематоксилин-еозин. Последващата обработка на материалите беше извършена в базата към катедра „Анатомия и клетъчна биология“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

4.3. Имунохистохимични оцветявания

4.3.1. Пероксидазна имунохистохимия

Оцветяванията бяха направени по стандартен пероксидазен метод. Първа стъпка от изработване на препаратите беше депарафиниране на тъканните срези чрез двукратното им поставяне в ксилол за 10 минути, след което бяха рехидратирани в низходяща алкохолна редица за 2 минути във всяка кювета (абсолютен алкохол, 90°, 80°, 70°) и накрая бяха потапяни в дестилирана вода. Следваше промиване в PBS за 5 минути на стайна температура (СТ). Следваща стъпка е антигенното възстановяване, което извършихме на водна баня в цитратен буфер (Ph 6) двукратно в продължение на 20 минути при температура 97°C и с последващо охлаждане до 65°C. Между всяка основна стъпка от оцветяването препаратите бяха промивани в PBS, 3x10 минути на СТ. Трета стъпка беше блокирането на ендогенната пероксидаза чрез пероксидазен блокиращ реагент на DAKO SM801 (готов за употреба) в продължение на 5 минути на СТ. Инкубирането в първичното анти тяло ZBTB20, заек (1:100; HPA016815, Sigma-Aldrich) беше за 20 минути на СТ. Инкубирането на вторичното анти тяло (HRP DAKO SM801-ready for use) беше също за 20 минути на СТ. В края на оцветяването инкубирахме тъканите в разтвор DAB+chromogen (DAKO K8024/Substrate buffer DAKO SM803) при разреждане 1:50, за 10 минути на СТ, последвано от промиване и оцветяване с хематоксилин за 5 минути. PBS беше под формата на таблетки, които биваха разтваряни в дестилирана вода. Използваната визуализираща система беше на DAKO – K8000.

4.3.2. Флуоресцентна имунохистохимия

Флуоресцентната имунохистохимия бе използвана за едновременното разкриване на 2 или 3 антигена на един и същи срез (двойна, респ. тройна имунофлуоресценция). За целта антигените бяха последователно визуализирани с вторични антитела, конюгирани с флуорохроми Alexa Fluor 488, 555, 568, 647 (Thermo Fisher Scientific). Alexa Fluor 488 излъчва в зеления, Alexa Fluor 555 – в оранжевия, Alexa Fluor 568 – в червения, а Alexa Fluor 647 в тъмночервения спектър. Използваният протокол за обработка на тъканите беше аналогичен с този, вече описан при светлинната микроскопия. Стъпките относно депарафинирането на препаратите и антигенното възстановяване напълно се припокриваха. Антигенното блокиране бе осъществено посредством инкубация в разредител (diluent) за 1 час на СТ, след което срезите бяха обградени с хидрофобен PAP pen и накапани с първичните антитела. Инкубацията беше с продължителност 12 ч. при 4°C, последвана от промиване и инкубация в съответното вторично антитяло, свързано с флуорохром за 2 ч., на СТ. Третирането на срезите с DAPI за 5 минути оцветяваше всички ядра в синьо, а последвалото третиране със Sudan Black за 5 минути имаше за цел минимализирането на автофлуоресценцията, дължаща се на дегенеративната акумулация на липофусцин в мозъчни клетки. Срезите бяха включени в специална среда (Vectashield, Vector Labs), съдържаща специфични реагенти, чието предназначение е да съхраняват флуоресценцията. Данните за използваните антитела са представени в Таблица 4.3. и Таблица 4.4.

Таблица 4.3. Списък на използваните първични антители, техния тип и използвана концентрация

Гостоприемник	Антитяло	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Заек	Anti-ZBTB201	Sigma Aldrich	HPA016815	1:100
Пиле	Anti-Iba12	Synaptic Systems	234006	1:500
Мишка	Anti-CD34	DAKO	IR632	готова за употреба
Пиле	Anti-GFAP3	Abcam	ab4674	1:800
Морско свинче	Anti-NeuN4	Sigma Aldrich	ABN90	1:4000
Заек	Anti-Sox105	LS Bio	LS-c743413-7	готова за употреба
Заек	Anti-S100 β	DAKO	z 0311	1:200

Използвани съкращения от англ. език: 1Zinc finger and BTB domain containing protein, 2Ionized calcium-binding adapter molecule 1, 3Glial fibrillary acidic protein, 4Neuronal Nuclear Antigen, 5SRY-related HMG-box 10.

Таблица 4.4. Списък на използваните вторични антители, техния тип и използвана концентрация

Флуорохром	Произведено в	Насочено срещу	Производител	Продуктов номер	Използвана концентрация
Alexa Fluor 488	коза	заек	Thermo Fisher Scientific	A-11034	1:200
Alexa Fluor 555	коза	заек		A-21428	1:200
Alexa Fluor 568	коза	мишка		A-21124	1:200
Alexa Fluor 647	коза	пиле		A-21449	1:200
Alexa Fluor 647	коза	морско свинче		A-21450	1:200
Alexa Fluor 555	коза	пиле		A-11040	1:200
Alexa Fluor 568	коза	морско свинче		A-11075	1:200
Alexa Fluor 647	коза	мишка		A-21240	1:200

4.3.3. Контролни оцветявания

Бяха изработени позитивни и негативни контроли с цел проверка на специфичността на имунологичните реакции.

Позитивни контроли: тъкани с известна пролиферация на позитивни за ZBTB20 клетки (хистологичен срез от глиобластом в човешка мозъчна тъкан) показаха ясна позитивна ядрена реакция. Тъй като ZBTB20 е ТФ, който обичайно е локализиран в клетъчното ядро, то само клетки с позитивна реакция в ядрото бяха отчетени като оцветени.

Негативни контролни оцветявания бяха направени чрез пропускане на първично анти тяло в инкубационната среда. Така оцветените тъкани останаха имунонегативни.

4.4. Дигитализиране на микроскопските препарати

Микроскопът Zeiss Axio Imager.Z2 беше използван за създаване на дигитални микроскопски изображения, предлагащ метод на сканиране по типа на мозайка. Чрез софтуера Zeiss Zen v3.7 и опцията за автофокусиране се осъществи прецизно фокусиране на отделните части от мозайката. По този начин различни артефакти от обработката на препаратите не повлияха качеството на получените образи. За получаването на дигитален образ на светлинномикроскопските препарати бе използвана цветна камера MRc, докато за имуофлуоресцентните изображения, които излъчват по-слаб сигнал, се заснемаше с по-високочувствителна монохромна камера MRm. Оригиналният формат на изображенията, генерирани посредством посочения софтуер, беше .czi. Впоследствие той беше преобразуван в .tiff формат, което позволяваше изображенията да бъдат обработвани в други софтуерни приложения.

Чрез фино модулиране и настройка на опциите, които са предоставени от Zeiss Zen v3.7 софтуера като например възможност за регулиране интензитета на белия цвят, модулиране интензитета на сенки и артефакти, използването на хистограма, даваща информация за времето на експозиция и съответно качеството на желания образ и редица други, както и чрез щателното почистване и поддържане на цялата работна система, бяха заснети светлинномикроскопските препарати.

Настройката на фокуса при имуофлуоресцентните изображения бе правена спрямо равнината на DAPI сигнала. Това всъщност предста-

вляваше избрана „изходна“ фокусна равнина, спрямо която бе изчислена фокусната дълбочина и бе настроено отместването на фокуса при всеки отделен използван флуоресцентен канал. Времето на експозиция бе регулирано отново с помощта на хистограма, като от изключително значение беше да не се допусне отслабване или изкривяване на сигнала.

4.5. Анализ на оцветяванията

Анализ на получените изображения беше направен с Fiji-дигитална система, чрез която ръчно бяха изброени позитивните клетки. Програмата позволява настройка на цвета на изображенията, използването на цветни или черно-бели изображения, регулиране интензитета на флуоресцентния сигнал за всеки канал поотделно, без риск сигналът да бъде намален, позволява наслагването на изображения, както и наслагването на флуоресцентни сигнали от различни канали, с възможност за паралелно броене в два отделни канала на едно и също изображение. Чрез опцията „multicount“ Fiji автоматично изброява маркираните ръчно позитивни клетки в рамките на предварително зададен регион на интерес (от англ. език region of interest, ROI), като съхранява текстов документ и образ от броенето, без да изменя оригиналното изображение. За целта бяха използвани няколко ROI за всяко едно изображение с размер 1000/1000 μm при пероксидазно имунохистохимично оцветяване и ROI 500/500 μm при флуоресцентните имунохистохимични оцветявания. Послойното разпределение на клетки в крайномозъчната кора беше анализирано в няколко ROI с размер 100/100 μm .

Photoshop бе използван за получаване на образи с високо качество и за демонстрация. Благодарение на това бяха премахнати артефакти и замърсявания, следствие на обработката на препаратите, и беше усилен интензитетът на флуоресцентния сигнал на единични случаи. С цел извличане на по-прецизни резултати беше използвана опцията за наслагване на изображения. По този начин беше анализирана експресията на маркери чрез имунофлуоресценция, когато различните антитела флуоресцираха в един и същ канал и в същото време се позитивираха от един и същ вид клетки. В тези случаи именно изображенията от оцветявания, направени на съседни хистологични срези, бяха наложени едно върху друго с цел изследване на ко-експресия в клетките.

Статистическата обработка на данните от количествения анализ бе направена чрез стандартни способи на Excel.

С помощта на PowerPoint и Adobe Illustrator 2022 бяха създадени фигурите за нагледно представяне на получените резултати.

4.6. Статистика

Резултатите от ръчно изброените позитивни клетки бяха въведени в стандартни .xlsx таблици. Данните за отделните случаи бяха осреднени за всеки ROI. Получиха се отделни групи от случаи със статистическо значение: (1) брой позитивни клетки в СМВ и в БМВ в срезите без мозъчна увреда (контролна група); (2) брой позитивни клетки според послойното им разпределение в крайномозъчната кора на контролните тъкани (3) брой позитивни клетки в СМВ и в БМВ в постисхемичните срези; (4) сравнителен количествен анализ между броя позитивни клетки в контролни и в постисхемични тъкани; (5) брой позитивни клетки според отстоянието им спрямо мозъчния инфаркт. Вариабилността на данните беше представена посредством изработването на графики с „error bars“ (стандартно отклонение). За оценка на статистическата значимост на разликите в резултатите на отделните изследвани групи бе използван Student's T test. Разликите бяха считани за значими при $P < 0,05$. Представи се процентното съотношение между популации от клетки на базата на експресията на различни маркери.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Морфологичен анализ на постисхемични човешки мозъчни тъкани

За адекватен анализ на микроскопски изображения на човешка мозъчна тъкан с исхемична увреда е от ключово значение дали при изработването мозъчната тъкан е свежа (замразени срези) или е фиксирана (парафинови блокчета). Локацията, размерът и характеристиките на макроскопската лезия са други критерии, които трябва да бъдат документирани. При наличие на хематом е задължително проучването на тъканта в периферните му участъци и направата на оценка на прехода към заобикалящата го тъкан. Препоръчително е при изследването на исхемичната мозъчна увреда да се изследват и двете мозъчни половини: ипсилатералната и контралатералната спрямо мозъчния инфаркт, но това не е задължително условие. При микроскопския анализ трябва да бъдат регистрирани също така хистологични белези, които могат да докажат етиологията на исхемичната увреда (Rahaman and Del Bigio, 2018).

Редица артефакти могат да окажат влияние върху микроскопската експертиза и подбора на подходящи хистологични препарати. Разлагането на тъканта е един от факторите, които затрудняват направата на правилна оценка. Автолиза (смилане и разграждане на тъканта от неконтролирано освобождаване на ензими от собствени клетки) и гниене (разграждане на тъканта в резултат на бактериален растеж) могат също да предизвикат макроскопски и микроскопски изменения, наподобяващи исхемична увреда. Типичните за мозъчния инфаркт „червени неврони“ могат да се наблюдават и при механична травма на тъканта преди фиксацията ѝ. Физиологични промени предшествващи смъртта, също могат да ги предизвикат. Не на последно място при анализ на микроскопски изображения, оцветени чрез флуоресцентна имунохистохимия, се наблюдава автофлуоресценция в клетки на нервната тъкан, която също може да компрометира изследването (Chatterjee 2014). Изследваните в настоящото проучване тъкани могат да бъдат групирани по морфологични критерии според давността на исхемичната увреда (Фигура 5.1.).

Количествено съотношение на анализираните случаи с исхемична увреда според давността на лезията



Фигура 5.1. На графиката се вижда процентното съотношение на случаите с инфаркт на мозъчната тъкан, обект на настоящото проучване, и тяхното разпределение според давността на лезията. Представени са 9 случая с морфологични данни за мозъчен инфаркт в подостра фаза, 2 случая с морфологични белези на инфаркт в хронична фаза и 1 случай с морфологични критерии, отговарящи на остра фаза на мозъчен инфаркт.

5.2. Количество и разпределение на ZBTB20-позитивните клетки

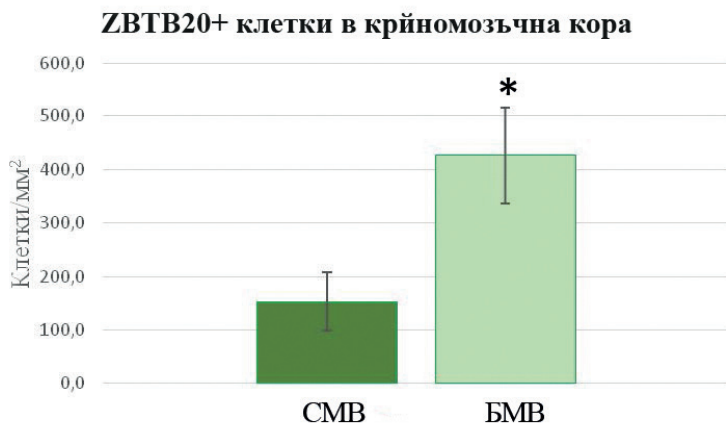
При изследването на клетки, позитивни за ZBTB20, се стартира с оцветявания, направени посредством пероксидазна имунохистохимия. Чрез този метод беше определена локализацията и количеството клетки, експресиращи ZBTB20.

Бяха открити клетки, които експресират ZBTB20 с различен интензитет. Най-голямо количество клетки с висок интензитет на експресия на ZBTB20 (ZBTB20^{high} клетки) беше регистрирано в повърхностните слоеве на крайномозъчната кора от контролните тъкани. В дълбочина броят клетки с висок интензитет на експресия постепенно намаляваше и се наблюдаваха единични клетки с нисък интензитет на експресия на маркера (ZBTB20^{low} клетки). Предимно умерен към нисък беше интензитетът на експресия в прилежащото БМВ. В мозъчните срези от постисхемични тъкани ZBTB20-позитивните клетки бяха с висок и с нисък интензитет на експресия (ZBTB20^{high} и ZBTB20^{low}), равномерно разпръснати в огнището на мозъчния инфаркт и в пенумбрата. В анали-

зираните случаи липсваше установима закономерност при разпределението на ZBTB20-позитивните клетки според интензитета на експресия в зоната на инфаркт на мозъчната тъкан. Поради тази причина изброяването на ZBTB20-позитивните клетки беше извършено независимо от интензитета на експресия, като за позитивни бяха отчетени тези клетки, чието ядрено оцветяване беше над фоновото.

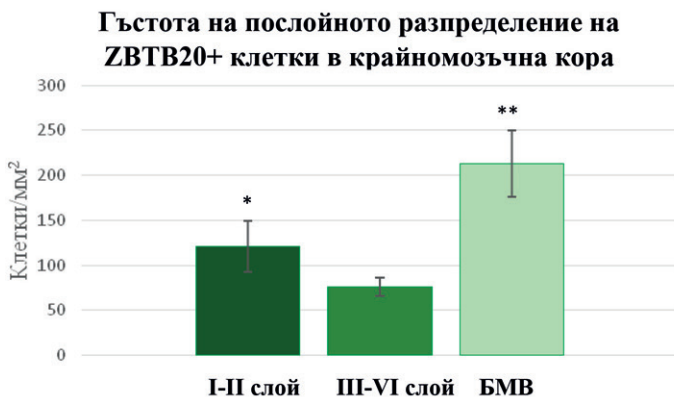
Изследванията върху ZBTB20-позитивните клетки започнаха от моторна крайномозъчна кора (gyrus precentralis): СМВ и прилежащо БМВ на пациенти без данни за неврологична увреда (контроли). Установи се, че е налична експресия в ядрата на клетки, разположени както в СМВ, така и в прилежащото БМВ.

Средният брой на ZBTB20-позитивни клетки в изследваните случаи (ROI 1000/1000 μm) е 154 позитивни клетки в СМВ и 426 клетки в прилежащото БМВ. Беше установена статистически значима разлика в броя позитивни клетки между СМВ И БМВ: $P < 0,0001$ (Фиг. 5.2.).



Фигура 5.2. Количествена характеристика на ZBTB20-позитивните клетки в СМВ и в прилежащо БМВ от мозъчна тъкан на пациенти без данни за неврологична увреда (контролна група), пероксидазна имунохистохимия. Ординатата показва брой клетки на мм^2 . С тъмнозелен цвят на графиката са представени брой ZBTB20-позитивни клетки в СМВ, а със светлозелен цвят – брой ZBTB20-позитивни клетки в прилежащото БМВ. Наблюдаваната разлика в броя ZBTB20-позитивни клетки спрямо тяхната локализация има статистическо значение: $P = 0,000000003$ ($P < 0,05$, Student's T test). * $P < 0,0001$

Следваща стъпка беше изследването на послойното разпределение на ZBTB20-позитивните клетки в крайномозъчната кора. Осъществено бе броене на позитивни клетки в региони от I^{-ви} до II^{-ри} слой, от III^{-ти} до VI^{-ти} слой, както и в БМВ в непосредствена близост с VI^{-ти} слой на крайномозъчната кора (ROI 100/100 μm). Най-голям беше броят на позитивните клетки в повърхността на кората, в дълбочина се откриха единични позитивни клетки и техният брой отново нарастваше в БМВ. При детайлния анализ се установи статистически значима разлика в разпределението на клетките, експресиращи ZBTB20 по слоеве. Значително по-голям беше средният брой на позитивните клетки в СМВ от областта на I^{-ви} до II^{-ри} слой от мозъчната кора спрямо средния брой позитивни клетки за останалите участъци в СМВ (от III^{-ти} до VI^{-ти} слой): $P=0,000002$ ($P<0,0001$, Student's T test). Най-голям беше броят на ZBTB20 експресиращите клетки в прилежащото БМВ. Този резултат, съотнесен към средния брой ZBTB20-позитивни клетки от СМВ в областта на I^{-ви} до II^{-ри} слой от мозъчната кора, показва статистически значима разлика: $P=0,00000004$ ($P<0,0001$, Student's T test). Получените данни са представени на Фигура 5.3.



Фигура 5.3. Количествена характеристика на послойното разпределение на ZBTB20-позитивни клетки в крайномозъчна кора на човек (контролна група), пероксидазна имунохистохимия. Ординатата показва брой клетки на mm^2 . Броят клетки, експресиращи ZBTB20 в СМВ, е представен от два региона: позитивни клетки в рамките на I^{-ви} до II^{-ри} слой на крайномозъчната кора (тъмнозелен цвят) и позитивни клетки в рамките на III^{-ти} до VI^{-ти} слой на крайномозъчната кора (яркозелен цвят).

Позитивни за ZBTB20 клетки бяха изброени и в БМВ в непосредствена близост с VI^{ми} слой на кората (светлозелен цвят). Наблюдаваната разлика в броя ZBTB20-позитивни клетки спрямо тяхната локализация има статистическо значение.

** При сравняване на ZBTB20-позитивни клетки в рамките на СМВ се наблюдава значително по-голям брой позитивни клетки в рамките на I^{ви} до II^{ри} слой спрямо същия брой клетки в рамките на III^{ти} до VI^{ми} слой на мозъчната кора: $P = 0,000002$
($P < 0,0001$, Student's T test).*

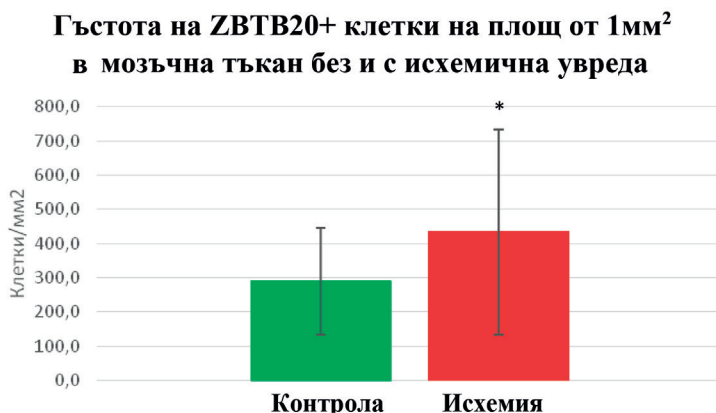
*** При сравняване на ZBTB20-позитивни клетки в рамките на I^{ви} до II^{ри} слой на мозъчната кора (СМВ) спрямо същия брой клетки в прилежащото БМВ се наблюдава значително по-голям брой позитивни клетки в БМВ: $P = 0,00000004$
($P < 0,0001$, Student's T test).*

Изследването продължи с анализ на тъкани с исхемична мозъчна увреда. Независимо от локализацията на мозъчния инфаркт (в кора или перивентрикуларно) ZBTB20-позитивни клетки аналогично бяха открити в СМВ и в БМВ. Първоначално беше определено количеството ZBTB20-позитивни клетки в СМВ и в БМВ, без да бъдат отчетени допълнителни фактори като локализацията (мозъчна кора или перивентрикуларно), стадий на инфаркта, възрастта на пациентите, ПМИ и пр. След сравнителен анализ на получените величини беше установено, че няма статистически значима разлика между експресията на ZBTB20 в СМВ и в БМВ след исхемична увреда. Незначително по-голям беше броят позитивни клетки в БМВ в постисхемичните тъкани: $P = 0,09$ ($P > 0,05$, Student's T test).

В крайния етап на анализ на оцветените посредством пероксидазна имунохистохимия препарати бяха сравнени получените резултати от контролната група пациенти с резултатите, получени при пациентите с исхемична мозъчна увреда. Първоначално беше направено сравнение на броя ZBTB20-позитивни клетки в СМВ в мозъчни тъкани без увреда и в постисхемични мозъчни тъкани. Полученият резултат има статистическо значение – много по-голям беше броят на позитивните клетки в СМВ след исхемична увреда: $P = 0,003$ ($P < 0,05$). Последва сравнителен анализ на резултатите в БМВ от същите групи пациенти. Броят на ZBTB20-позитивни клетки в БМВ след исхемична увреда беше уве-

личен, но без статистически значима разлика спрямо броя позитивни клетки в БМВ на контролната група пациенти.

Във финалния етап на анализа беше съотнесен общият брой ZBTB20-позитивни клетки на площ от 1 мм² в контролните групи пациенти, независимо от локализацията им в СМВ или в БМВ към общия брой ZBTB20-позитивни клетки в постисхемичните тъкани, изброени в центъра на мозъчен инфаркт и независимо от други фактори. Резултатите бяха следните: 290 ZBTB20-позитивни клетки на площ от 1 мм² за контролните тъкани и 526 ZBTB20-позитивни клетки на площ от 1 мм² за постисхемичните тъкани. Следователно в мозъчни тъкани с исхемична увреда ZBTB20-позитивните клетки на площ от 1 мм² бяха 1,8 пъти повече ($P=0,04$; $P<0,05$, Student's T test) (Фиг. 5.4.).



Фигура 5.4. Количествена характеристика на експресията на ZBTB20 в клетки от контролни и от постисхемични човешки мозъчни тъкани, оцветени чрез пероксидазна имунохистохимия. На ординатата е изобразен броят позитивни клетки за мм². Общият брой ZBTB20-позитивни клетки в мозъчни тъкани без исхемична увреда на площ от 1мм² е по-малък от общия брой ZBTB20-позитивни клетки в тъкани с исхемична мозъчна увреда на същата площ. Получените резултати имат статистическо значение.

* $P=0,04$ ($P < 0,05$, Student's T test).

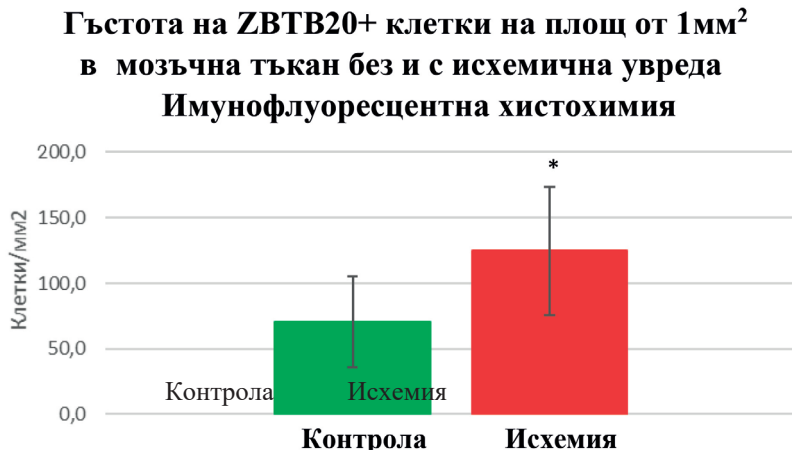
Интерес представляваше една особеност на локализацията на ZBTB20-позитивните клетки в СМВ от контролните и от постисхемичните човешки мозъчни тъкани. Около телата на невроните, които бяха дискретно маркирани от оцветяването чрез пероксидазна имунохистохимия, се наблюдаваше струпване на клетки с позитивна ядрена реакция за ZBTB20. В малко зони от тъканните срези тези клетки бяха единични. В редица участъци от микроскопските препарати около невроните се наблюдаваха по две ZBTB20-позитивни клетки, които бяха определени като „дублети“ от периневронални клетки. В някои случаи тези т. нар. „дублети“ бяха всъщност две клетки с позитивна ядрена реакция за ZBTB20 от общо три клетки около невроните. Тоест не всички клетъчни ядра с периневронална локализация експресираха ZBTB20. Интензитетът на ядрена експресия на ZBTB20 от тези периневронални клетки също беше различен. Наблюдаваха се клетки както с висок интензитет на експресия на ZBTB20 (ZBTB20^{high} клетки), така и клетки с по-нисък интензитет на експресия на маркера (ZBTB20^{low} клетки).

5.3. Експресия на ТФ ZBTB20 – флуоресцентна имунохистохимия

Следващ етап в проучването беше направата на имунофлуоресцентно оцветяване за ZBTB20. Основната задача беше да се установи в изследваните срези количеството ZBTB20-позитивни клетки спрямо цялата клетъчна популация, чиито ядра бяха маркирани с DAPI. Средният общ брой ZBTB20-позитивни клетки на площ от 1 mm² независимо от тяхното разпределение в СМВ или в БМВ в контролните групи пациенти беше 142 клетки. При аналогичен анализ в постисхемичните тъкани беше установено наличието на средно 250 ZBTB20-позитивни клетки на площ от 1 mm² в огнището на мозъчния инфаркт, без да се отчитат точната му локализация (мозъчна кора или перивентрикуларно), разпределението на позитивните клетки в СМВ или в БМВ, или други фактори. Тези резултати сочеха, че броят на ZBTB20-позитивните клетки в постисхемични мозъчни тъкани е нараснал 1,8 пъти спрямо средното количество ZBTB20-позитивни клетки в контролните тъкани: $P = 0,005$ ($P < 0,05$) (Фиг. 5.5.).

В контролната група пациенти след изброяването беше установено, че ZBTB20-позитивни клетки представляваха 8% от цялата клетъчна популация в изследваните срези, където клетъчните ядра бяха маркирани

с DAPI. След ишемична увреда количеството ZBTB20-позитивни клетки представляваше отново 8% от цялата клетъчна популация.



Фигура 5.5. Количествена характеристика на експресията на ZBTB20 в клетки от контролни и от постисхемични човешки мозъчни тъкани, оцветени чрез флуоресцентна имунохистохимия. На ординатата се вижда броят ZBTB20-позитивни клетки на мм². Демонстрира се посредством статистическото изображение, че броят ZBTB20-позитивни клетки е много по-голям в мозъчните тъкани с ишемична увреда (червен цвят) сравнено с броя ZBTB20-позитивни клетки в контролните мозъчни тъкани (зелен цвят). Наблюдаваната разлика има статистическо значение.

* $P=0,005$ ($P<0,05$) Student's T test

Трети етап в проучването беше направата на имунофлуоресцентни оцветявания за ZBTB20 в комбинация с други маркери.

5.4. Маркер за неврони

Първоначалната комбинация от оцветявания беше направена с анти тяло срещу невроналния ядрен антиген/Neuronal Nuclear Antigen (NeuN) – протеин, локализиран в ядрото и перинуклеарно в цитоплаз-

мата на невроните (Tian et al. 2018). Не се откриха двойно позитивни клетки за ТФ *ZBTB20* и протеина NeuN нито в срези от контролни, нито в срези от постисхемични мозъци. Следователно *ZBTB20* не се експресира от зрели неврони. Отново около невроните се наблюдаваха *ZBTB20*-позитивни клетки, което насочваше към предположението, че тези клетки са глиални.

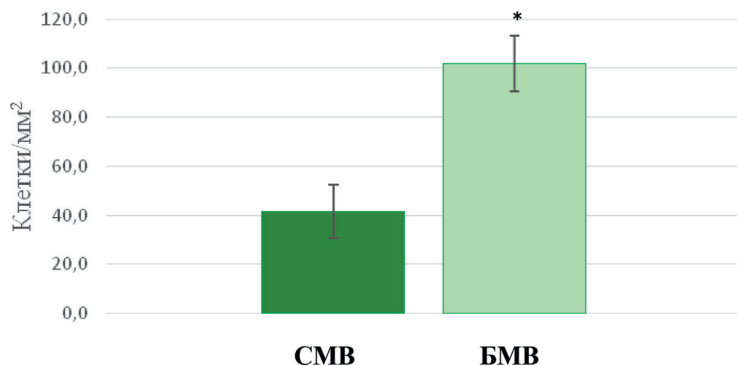
5.5. Маркери за астроцити

5.5.1. GFAP

Следващият маркер, който беше използван за целите на проучването, беше антитяло срещу Glial fibrillary acidic protein (GFAP) – протеин, който изгражда астроцитните интермедиерни филаменти (Eng 1985). В хода на експеримента беше открита ко-експресия за ТФ *ZBTB20* и протеина GFAP в клетки, намиращи се СМВ и в БМВ както в тъкани от контролната група пациенти, така и в тъкани с исхемична увреда. Послойното разпределение на *ZBTB20*-позитивните клетки в моторната крайномозъчна кора от контролните тъкани се запазва със същия характер и при *ZBTB20*+/GFAP+ клетките. Не всички GFAP-позитивни астроцити бяха *ZBTB20*-позитивни.

Количественият анализ стартира с изброяване на двойнопозитивни клетки в СМВ и в БМВ в срези от крайномозъчна кора на контролната група пациенти и ROI 500/500 μm . Резултатите бяха аналогични с тези от предходните изброявания. Статистически значима разлика в броя *ZBTB20*+/GFAP+ клетки беше установена спрямо тяхната локализация в СМВ или в БМВ: $P = 0,0000000000005$ ($P < 0,0001$, Student's T test) (Фиг. 5.6.).

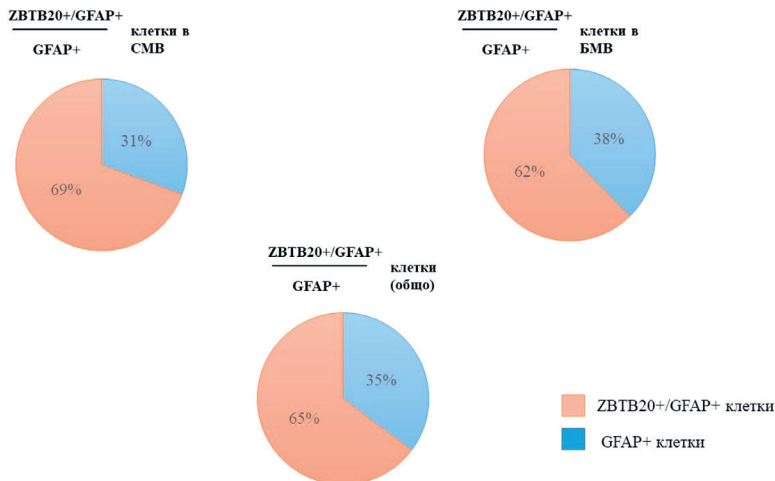
ZBTB20+/GFAP+ клетки в крайномозъчна кора



Фигура 5.6. Гъстота на ZBTB20+/ GFAP+ клетки в крайномозъчна кора (CMB и прилежаща БМВ) от човешки мозъчни тъкани без исхемична увреда (контролна група), флуоресцентна имунохистохимия. На ординатата се виждат брой клетки за мм². По-голям е броят двойнопозитивни клетки в БМВ (светлозелен цвят) спрямо CMB (тъмнозелен цвят).

*Получената разлика има статистическо значение: $P = 0,00000000005$ ($P < 0,0001$, Student's T test)

Следваща стъпка беше да се определи какъв процент представляват ZBTB20+/GFAP+ клетки спрямо популацията глиални клетки, експресираща протеина GFAP в изследваните случаи на площ от 0,5 мм (ROI 500/500 μm). Аналогичен анализ беше направен и в постисхемичните срези, без да бъде отчетено влиянието на допълнителни фактори. ZBTB20+/GFAP+ клетки бяха изброени в огнището на мозъчния инфаркт и резултатите бяха съотнесени към общия брой GFAP-позитивни клетки в изследваните срези. Съотношението на ZBTB20+/GFAP+ клетки спрямо GFAP-позитивни астроцити се беше запазило почти същото в контролните случаи и в случаите с исхемична увреда (Фиг. 5.7.).



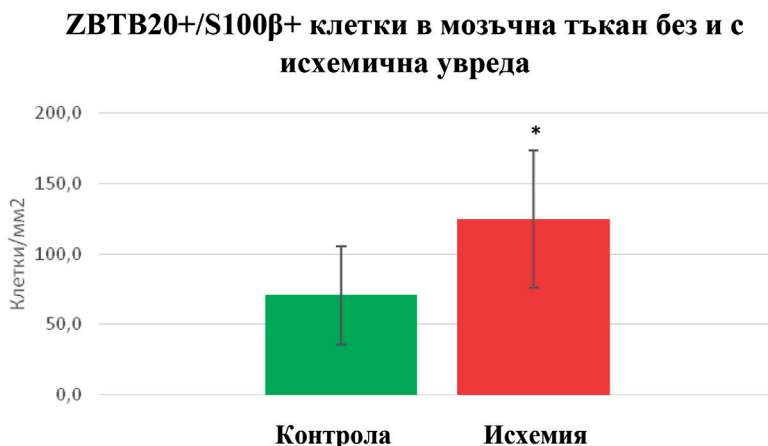
Фигура 5.7. Графиките показват каква част от GFAP-позитивните клетки са позитивни и за ТФ ZBTB20 съответно в СМВ и в БМВ, както и същото съотношение независимо от разпределението на позитивните клетки в контролните тъкани. Двойнопозитивните клетки за ZBTB20 и GFAP са средно 69% от цялата GFAP-позитивна клетъчна популация в СМВ. В БМВ те представляват 62%. Двойнопозитивните клетки са средно 65% от всички GFAP-позитивни клетки, независимо от тяхното разпределение в СМВ или в БМВ.

5.5.2. S100 β

Астроцитите бяха оцветени също така и с антитяло срещу цитоплазмения калций-свързващ протеин s100 β (Ludwin, Kosek, and Eng 1976).

Извърши се паралелно броене за маркерите на съответните срези, както и броене с наслаждане образите на два съседни среза. Първоначално анализът започна с определяне количеството на ZBTB20+/S100 β + клетки в крайномозъчната кора (СМВ и прилежащо БМВ) от контролната група пациенти. Двойнопозитивните клетки представляваха 69% от цялата S100 β -позитивна клетъчна популация в СМВ и 61% от цялата S100 β -позитивна клетъчна популация в БМВ. След това бяха сравнени

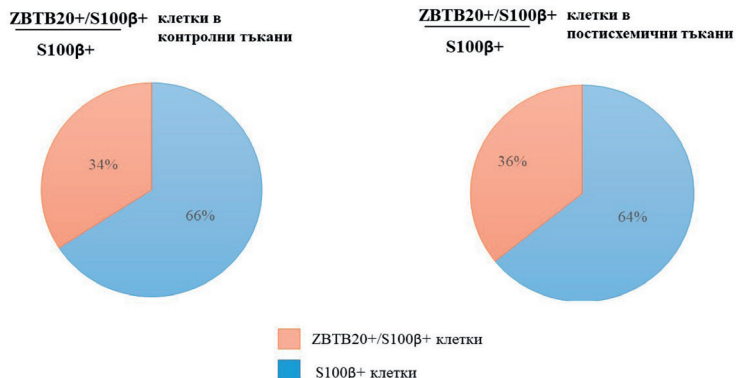
общият брой ZBTB20+/S100 β + клетки в тъкани без неврологична увреда с общия брой ZBTB20+/S100 β + клетки в постисхемичните тъкани, определен в огнището на мозъчния инфаркт, независимо от неговата локализация (мозъчна кора или перивентрикуларно). Съответно количеството двойнопозитивни клетки беше около 1,8 пъти по-голямо в тъкани след исхемична увреда в сравнение с контролните тъкани $P=0,005$ ($P<0,05$) (Фиг. 5. 8.).



Фигура 5.8. Графиката представя сравнителен анализ на количеството ZBTB20+/S100 β + клетки в контролни и в постисхемични човешки мозъчни тъкани, флуоресцентна имунохистохимия. Ординатата представя брой позитивни клетки за мм². Много по-голям е броят двойнопозитивни клетки в тъканите с исхемична увреда (червен цвят) спрямо същия брой клетки в контролната група тъкани (зелен цвят). Получените от анализа резултати имат статистическо значение.

* $P=0,005$ ($P<0,05$) Student's T test

Получените данни за постисхемичните тъкани бяха съотнесени към цялата клетъчна популация от глиални S100 β -позитивни клетки в съответните срези. Беше установено, че процентното съотношение между ZBTB20+/S100 β + клетки и S100 β -позитивните астроцити се запазва почти същото както в тъкани без увреда, така и в постисхемични тъкани (Фиг. 5.9.).



Фигура 5.9. Графиката показва съотношението на ZBTB20+/S100β+ клетки спрямо цялата S100β-позитивна глиална клетъчна популация: сравнителен анализ на получените резултати между контролните и постисхемичните човешки мозъчни тъкани.

5.6. Съдов маркер

За демонстрация на периваскуларно разположени ZBTB20-позитивни клетки беше използван съдов маркер – CD34. Той представлява антитяло срещу трансмембранен протеин в ендотелните клетки (Steen and Egeland 1998). Тези ZBTB20-позитивни клетки всъщност представляваха периваскуларни GFAP-позитивни астроцити, които участват във формирането на КМБ. Периваскуларни ZBTB20-позитивни астроцити бяха открити както в контролните, така и в постисхемичните случаи. От имунохистохимичното оцветяване със CD34 беше установено чрез наслагването на изображения (на съседни срези, оцветени със съответния маркер) струпване на голям брой ZBTB20+/GFAP+ клетки периваскуларно около капиляри сред инфарцираната тъкан. Струпвания от двойнопозитивни клетки бяха налични и около по-големи кръвоносни съдове, разположени в пенумбрата.

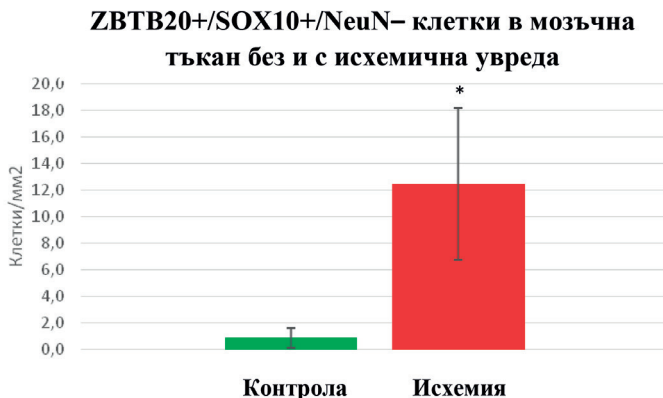
5.7. Маркер за олигодендроцити

Изследванията за ко-експресия на ZBTB20 и дуги маркери продължиха с използването на антитяло, маркиращо ТФ SOX10.

5.7.1. ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетъчна субпопулация

В моторна крайномозъчна кора в СМВ и в прилежащо БМВ на пациенти без данни за неврологична увреда се установиха единични ZBTB20+/SOX10+ клетки, като всяка една от тях беше негативна за протеина NeuN. Тази ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетъчна популация беше локализирана в СМВ и в БМВ. Тя представляваше под 1% от цялата популация клетки в изследваните срези.

В мозъчна тъкан след исхемична увреда обаче количественият анализ показва, че броят на ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетки значително се е увеличил. Не открихме NeuN-позитивни неврони, които да коекспресират ZBTB20 или SOX10. Броят ZBTB20+/SOX10+ клетки, изброени в зоната на мозъчния инфаркт обаче, представляваше около 9% от общия брой ZBTB20-позитивни клетки. При сравняване на резултатите за количеството ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетки в контролните тъкани спрямо постисхемичните тъкани се установи, че ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетъчната популация е нараснала с 15 пъти в срезите с исхемична мозъчна увреда: $P=0,0005$ ($P<0,05$). (Фиг. 5.10.).



Фигура 5.10. Графиката показва количествен анализ на ZBTB20+/SOX10+/NeuN– клетъчната популация: сравнение между контролните и постисхемичните човешки мозъчни тъкани, флуоресцентна имунохистохимия. Ординатата представя брой позитивни клетки за мм². По-голям брой двойнопозитивни клетки са отчетени в постисхемичните човешки мозъчни тъкани (червен цвят) спрямо контролните тъкани (зелен цвят).

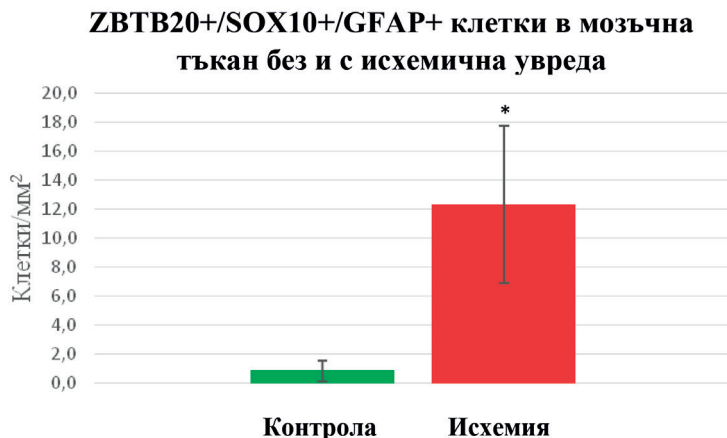
Установените разлики имат статистическо значение.

* $P=0,0005$ ($P<0,05$) Student's T test

5.7.2. ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетъчна субпопулация

Осъществихме тройно имунофлуоресцентно оцветяване за ТФ ZBTB20, протеина GFAP и ТФ SOX10 върху същите случаи. Бяха открити единични ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетки както в СМВ, така и в БМВ на срези от контролните пациенти. Те отново представляваха под 1% от цялата клетъчна популация на изследваните срези. На срези от постисхемични мозъци се установи, че всички ZBTB20+/SOX10+ клетки експресират и GFAP.

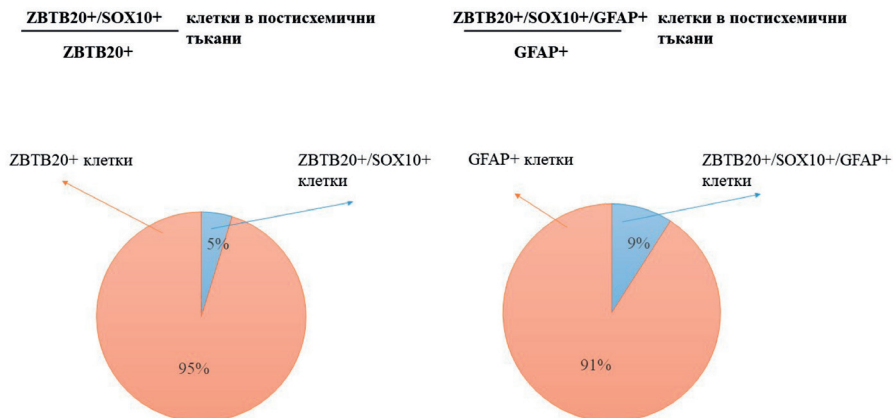
Количественият анализ показва, че популацията от клетки, тройно позитивна за ТФ ZBTB20, ТФ SOX10 и протеина GFAP, е нараснала 15 пъти след исхемична увреда (Фиг. 5.11.). Не всички ZBTB20-позитивни клетки експресираха и SOX10, но всички клетки, които бяха двойно-позитивни за ZBTB20 и SOX10 в постисхемичните човешки мозъчни тъкани, експресираха и трети маркер – GFAP. Съответно ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетките представляваха само част от GFAP-позитивните клетки.



Фигура 5.11. Графиката илюстрира паралелния анализ на клетъчната гъстота в контролните и в постисхемичните тъкани на ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетки, флуоресцентна имунохистохимия. На представената графика ординатата изобразява брой позитивни клетки за мм². Значително по-голям е броят на ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетките в постисхемичните тъкани (червен цвят) в сравнение с контролните тъкани (зелен цвят). Наблюдаваната разлика има статистическо значение.

* $P=0,0005$ ($P<0,05$) Student's T test

Количествените съотношения между тези клетъчни субпопулации са представени в графичен вид (Фиг. 5.12.). ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетъчната популация представляваше 5% спрямо общия брой GFAP-позитивни клетки в изследваните постисхемични тъкани.



Фигура 5.12. Диаграмите показват следните количествени съотношения: процентно съотношение на ZBTB20+/SOX10+ клетки спрямо ZBTB20-позитивни клетки и ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетки спрямо GFAP-позитивни клетки в постисхемичните човешки мозъчни тъкани. ZBTB20+/SOX10+ клетките представляват 9% от всички ZBTB20-позитивни клетки. Тройнопозитивните ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ представляват 5% от всички GFAP-позитивни клетки. Всички ZBTB20+/SOX10+ клетки са GFAP-позитивни клетки.

Интерес представляваше морфологията на ZBTB20+/SOX10+/GFAP+ клетките. В постисхемичните тъкани те притежаваха всички микроскопски белези на реактивни глиални клетки: бяха с хипертрофия на клетъчните тела и израстъци, с уголемени клетъчни ядра. Израстъците им бяха много дълги и разклонени. Не всички израстъци можеха да бъдат проследени, тъй като излизаха извън границите на сканирания участък от препарата. Влизаха в контакт както помежду си, така и с други глиални клетки около тях. Някои от тях бяха открити поединично около невроните в СМВ на постисхемичните тъкани. Голяма част от тези клетки влизаха в контакт с намиращи се в съседство кръвоносни съдове.

Чрез флуоресцентна имунохистохимия се виждат в човешка мозъчна тъкан ZBTB20-позитивни клетки около неврони в СМВ след исхемия, които освен ZBTB20 започват да експресират и SOX10. Докато периневроналните клетки, които експресират ZBTB20 с нисък интензитет, са позитивни и за SOX10 (ZBTB20^{low}/SOX10⁺ клетки), периневроналните клетки, които експресират ZBTB20 с висок интензитет, са негативни за SOX10: ZBTB20^{high}/SOX10⁻ клетки.

5.8. Постисхемични тъкани – обобщен статистически анализ

5.8.1. Влияние на локализацията на мозъчния инфаркт върху експресията на ТФ ZBTB20

Начален етап в детайлното изучаване на предоставените за анализ постисхемични тъкани беше групирането им в зависимост от локализацията на мозъчния инфаркт. В шест от случаите инфарктът беше разположен в близост с крайномозъчната кора, засягайки не само СМВ, но и БМВ в съседство (*група I*). В други шест случая мозъчният инфаркт беше локализиран перивентрикуларно със засягане на намиращите се в съседство базални ганглии и БМВ (*група II*). И в двете групи тъкани позитивните за съответните маркери клетки бяха изброени в центъра на исхемичната лезия.

Първоначално беше направен сравнителен анализ на общия брой ZBTB20-позитивни клетки в група I спрямо група II. Получената разлика нямаше статистическо значение, $P=0,42$ ($P>0,05$, Student's T test).

Впоследствие определихме, че количеството ZBTB20+/GFAP+ клетки в първата група случаи представляваше 32% спрямо цялата GFAP-позитивна клетъчна популация в този регион. При аналогичен анализ във втората група случаи ZBTB20+/GFAP+ клетките представляваха 39% спрямо цялата GFAP-позитивна клетъчна популация за съответната област. Съпоставими бяха резултатите и при изследването на ко-експресията на ТФ ZBTB20 и протеина S100 β . Двойнопозитивните клетки в първата група случаи представляваха 32% от цялата S100 β -позитивна клетъчна популация, а тези във втората група случаи бяха 36% от S100 β -позитивните астроцити. Броят на клетките, които коекспресират ТФ ZBTB20 и протеина GFAP или ТФ ZBTB20 и протеина S100 β , не зависеше от локализацията на исхемичната мозъчна увреда. Съотношението спрямо цялата GFAP-позитивна или цялата S100 β -позитивна

астроглиална популация в дадения мозъчен регион се запазваше почти същото.

5.8.2. Влияние на морфологичните характеристики на мозъчния инфаркт върху експресията на ТФ ZBTB20

Следваща стъпка беше да се групират случаите с исхемична увреда според давността на лезията – мозъчен инфаркт в остър, подостър или хроничен стадий (виж Фиг. 5.1.). Най-голямо количество ZBTB20-позитивни клетки се наблюдаваха в острата фаза на исхемия. Броят позитивни клетки намаляваше в подостратата фаза и отново се покачваше леко в хроничната фаза.

В два от случаите имаше налична хеморагична компонента. Единият случай беше с морфологични данни за мозъчен инфаркт в подостра фаза, а другият с морфологични данни за мозъчен инфаркт в хронична фаза. Локализацията на лезията и в двата случая беше перивентрикуларно, като бяха налични и клинични данни за кръвоизлив с пробив във вентрикулната система. Наличието на хеморагична компонента в представените два случая не е оказало влияние върху експресията на ТФ ZBTB20. Количеството ZBTB20-позитивни клетки в тях се запазва близко до средното количество ZBTB20-позитивни клетки съответно за подострата или хроничната фаза на мозъчен инфаркт без хеморагия.

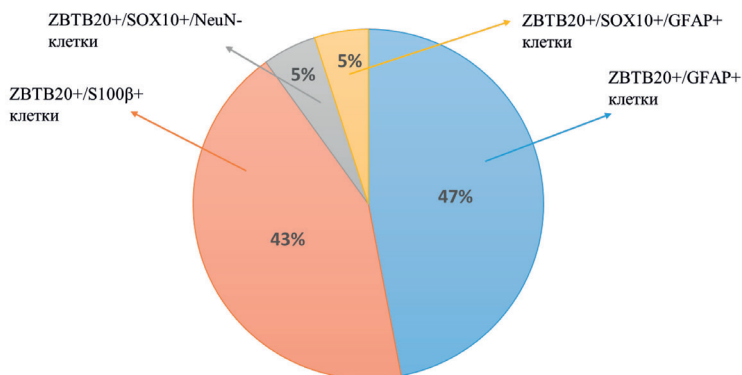
5.8.3. Разпределение на експресията на ТФ ZBTB20 според отстоянието на позитивните клетки спрямо исхемичната лезия

В два от случаите имаше възможност да бъдат изброени ZBTB20-позитивни клетки в центъра на исхемичната лезия, а също и в пенумбрата. В тези два случая мозъчният инфаркт беше локализиран в областта на крайномозъчната кора, засягайки СМВ и намиращото се в съседство БМВ. Освен експресиращи ZBTB20 клетки в огнището на увредата бяха изброени и такива на отстояние от нея, намиращи се в пенумбрата. Най-голямо количество ZBTB20-позитивни клетки бяха изброени в огнището на исхемичната увреда. С отдалечаване от нея броят позитивни клетки постепенно намаляваше, като беше най-нисък в най-периферните участъци на пенумбрата. Разликата в броя ZBTB20-позитивни клетки имаше статистическо значение: $P = 0,006$ ($P < 0,05$, Student's T test).

5.8.4. Съотношение между различните клетъчни субпопулации в постисхемичните мозъчни тъкани

С изложената по-долу диаграма (Фиг.5.13.) е предложен прочит на молекулярния профил на глиалните мозъчни клетки според резултатите от направения научен експеримент.

Пропорция на отделни глиални субпопулации от всички глиални клетки в постисхемични мозъчни тъкани



Фигура 5.13. Показани са четири субпопулации от глиални клетки на базата на експресията на ZBTB20, GFAP, S100β, SOX10 и NeuN в анализираните постисхемични човешки мозъчни тъкани. Най-голям процент клетки, експресиращи ZBTB20 в ядрата си, представляват глиалните GFAP⁺ и S100β⁺ клетъчни субпопулации.

5.9. Маркер за микроглия

За да се визуализират имунохистохимично микроглиалните клетки, беше използвано антитяло срещу протеина Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1). (Smirkin et al. 2010). Получените резултати сочеха, че IBA1-позитивните микроглиални клетки не експресират ТФ ZBTB20 нито в контролните мозъчни тъкани, нито в постисхемичните мозъчни тъкани.

6. ОБСЪЖДАНЕ

6.1. ТФ ZBTB20 се експресира в сиво и в бяло мозъчно вещество на човек при физиологични условия и след исхемична увреда

Настоящото проучване за първи път демонстрира експресията на протеина в клетки от адултна крайномозъчна кора (СМВ и прилежащо БМВ) на човек във физиологични условия и в клетки на СМВ и на БМВ след исхемична увреда (в зоната на мозъчен инфаркт) в човешка крайномозъчна кора и перивентрикуларно. В контролните мозъчни тъкани бе разгледано детайлно послойното разпределение на ZBTB20-позитивните клетки в човешката моторна кора. Откриха се клетки с различен интензитет на експресия на ZBTB20: ZBTB20^{high+} клетки, които преобладаваха в повърхностните слоеве на крайномозъчната кора, и ZBTB20^{low+} клетки, които преобладаваха в по-дълбоките слоеве на крайномозъчната кора. В БМВ и в зоната на мозъчен инфаркт ZBTB20^{high+} и ZBTB20^{low+} клетките бяха равномерно разпределени.

Направи се количествен анализ на броя ZBTB20-позитивни клетки според тяхната локализация в СМВ или в БМВ. Много по-голям е броят на ZBTB20-позитивните клетки в БМВ спрямо СМВ в контролните мозъчни тъкани. Най-голямо количество ZBTB20-позитивни клетки се откриха в слой I-II от крайномозъчната кора (СМВ), но въпреки това количеството им беше значително по-голямо в прилежащото БМВ. В постисхемичните мозъчни тъкани отново по-голямо количество ZBTB20-позитивни клетки се наблюдаваха в БМВ спрямо СМВ, но регистрираната разлика нямаше статистическо значение.

6.2. Сравнителен количествен анализ на експресията на ТФ ZBTB20 в контролни и в постисхемични мозъчни тъкани

Изучаването на клетъчни и субклетъчни структури и механизми посредством опитни животни е наложен способ в науката. Експерименталните модели при гризачи дават добра основа за по-нататъшно изследване върху примати, в това число и при човек. Доерпнер и сътрудници демонстрират (Доерпнер, Herz, Bahr, et al. 2019):

- При мишки хетерозиготи ($Zbtb20^{+/-}$) броят на глиалните клетки, експресиращи протеина $Zbtb20$, е намален в сравнение с мишки хомозиготи ($Zbtb20^{+/+}$).
- При мишки хетерозиготи ($Zbtb20^{+/-}$) се наблюдава слаба глиална пролиферация и намалено количество клетки, позитивни за $Zbtb20$ след исхемична мозъчна увреда.
- При мишки хомозиготи ($Zbtb20^{+/+}$) се наблюдава ексцесивна глиална пролиферация и съответно експресия на $Zbtb20$ след исхемична мозъчна увреда.

Настоящият експеримент е в съответствие с предоставените данни при опитни гризачи. Демонстрирана е експресията на протеина ZBTB20 в клетки от адултни човешки мозъчни тъкани ($ZBTB20^{+/+}$) без налична увреда и в постисхемични мозъчни тъкани. При сравняване на контролните с постисхемичните мозъчни тъкани се установи, че е много по-голям броят ZBTB20-позитивни клетки в СМВ и в БМВ с исхемична увреда спрямо броя ZBTB20-позитивни клетки в СМВ и в БМВ без исхемична увреда. В два от случаите с инфаркт на мозъчата тъкан при човек се наблюдава аналогичен паралел в количественото разпределение на ZBTB20-позитивните клетки. Най-голямо количество са локализирани в центъра на инфаркта, а с отдалечаването от него броят им постепенно намалява и е по-малък в пенумбрата.

Сравнителен количествен анализ на изложените данни е направен на базата на резултати, получени посредством две различни методики за обработка на мозъчните тъкани – пероксидазна имунохистохимия и флуоресцентна имунохистохимия. Получените резултати имат статистическо значение. Описани са малки разлики в количеството клетки, експресиращи ТФ ZBTB20. Посредством и двете методики обаче като заключение се регистрира учвеличение с 1,8 пъти на броя ZBTB20-позитивни клетки след исхемична увреда.

От представения анализ на имунофлуоресцентни изображения се установи също така какво е количеството ZBTB20-позитивни клетки спрямо цялата клетъчна популация в съответните изследвани срези. ZBTB20-позитивните клетки представляваха 8% от цялата клетъчна популация както в контролните, така и в постисхемичните мозъчни тъкани. Въпреки че броят ZBTB20-позитивни клетки нараства след исхемия,

нараства и общото количество клетки в зоната на инфаркт на тъканта в резултат на реактивна глиоза (Alhadidi et al. 2023). Това демонстрира, че съотношението ZBTB20-позитивни клетки спрямо общото количество клетки на площ от 1мм² се запазва непроменено след исхемична увреда.

6.3. Фенотип на ZBTB20-позитивните клетки в мозъчни тъкани при физиологични условия и след исхемична увреда

Доказано е, че липсва ко-експресия за ТФ ZBTB20 и протеина NeuN в зряла мозъчна тъкан при гризачи (Nagao et al. 2016) и при маймуни макак (Stoyanov et al. 2022). Настоящото изследване демонстрира за първи път липсата на подобна ко-експресия в адултна човешка мозъчна тъкан от моторна кора. Исхемичната мозъчна увреда не оказва влияние върху имунохистохимичния профил на тази популация от клетки.

Използвани за идентифицирането на астроцити маркери са GFAP и S100β. За пръв път показахме, че ZBTB20-позитивните клетки са всъщност GFAP-позитивни астроцити в човешка адултна мозъчна тъкан от моторна кора. Всички ZBTB20-позитивни клетки бяха позитивни и за GFAP, но не всички GFAP-позитивни астроцити експресираха ZBTB20. Представено бе послойното разпределение на двойнопозитивните клетки в моторната човешка кора и в прилежащото БМВ. За пръв път беше направен детайлен анализ на разпределението на ZBTB20+/GFAP+ клетки спрямо локацията сиво – бяло мозъчно вещество. Аналогичен анализ направихме и в постисхемични човешки мозъчни тъкани с исхемична увреда, локализирана в областта на мозъчната кора и перивентрикуларно. В зоната на мозъчния инфаркт беше регистрирано повишено количество ZBTB20+/GFAP+ клетки. Отново идентична картина се наблюдава в мозъчна кора с исхемична увреда при опитни мишки от експеримента на Döerppner et al. Исхемичната увреда е причина за повишен брой ZBTB20+/GFAP+ клетки в ипсилатералните на инсульта участъци от мозъчната тъкан (Döerppner, Herz, Bahr, et al. 2019).

Паралелен анализ на астроглиалните клетки бе направен и посредством S100β. Извърши се броене за ко-експресия на ZBTB20 и S100β в клетки на съседни срези. Въпреки че този начин на отчитане на данни не е абсолютно точен, то получените резултати са почти аналогични с

резултатите от изброяването на ZBTB20+/ GFAP+ клетки. До момента е известно, че експресията на GFAP и S100 β в астроглиални клетки от адултна мозъчна тъкан се припокрива в голям процент. В крайномозъчната кора 98.8% от GFAP-позитивните астроцити са позитивни и за S100 β , в корпус калозум S100 β -позитивните астроцити представляват 96.3% от GFAP-позитивната клетъчната популция, а в стриатум – 98.8% (Raponi et al. 2007). Според изброяванията от настоящия анализ S100 β -позитивните астроцити представляват около 90% от GFAP-позитивната клетъчната популция в контролните тъкани. Запазва се аналогичен паралел между гъстотата на ZBTB20+/ GFAP+ клетки и на ZBTB20+/S100 β + клетки в постисхемичните тъкани. Тези резултати потвърждават известното до момента, че в адултна мозъчна тъкан след исхемична увреда съответствието между броя клетки, експресиращи GFAP и S100 β , се запазва (Janigro et al. 2022). Следователно представените данни са достоверни.

Периваскуларна локализация на ZBTB20-позитивни клетки е демонстрирана чрез оцветяване на съдовия ендотел с флуоресциращо антитяло срещу мембранный протеин CD34. Процент от GFAP-позитивните астроцити, влизащи в контакт с кръвоносните съдове и участващи в изграждането на КМБ, са също ZBTB20-позитивни. Броят на периваскуларните ZBTB20-позитивни клетки се увеличава в мозъчна тъкан с исхемична увреда. Наблюдава се подчертано сгрупване на ZBTB20-позитивни клетки около увредени в резултат на исхемията кръвоносни съдове. Субпопулация от ZBTB20+/ GFAP+ клетки около кръвоносните съдове представлява интерес поради две причини. Първата е ролята ѝ относно поддържането на хомеостазата на нервната тъкан и интегритета на КМБ във физиологични условия (Takahashi 2022). Втората причина е поради участието ѝ в патогенезата на исхемичната увреда. При настъпването на исхемичен мозъчен инфаркт нарушаването целостта на КМБ се явява първоначално събитие в хода на развитие на лезията (Alhadidi et al. 2023). Дали нарушаването на дезинтегритета на КМБ има пряко отношение към нивата на експресия на ТФ ZBTB20 в периваскуларните астроглиални клетки е обект на допълнителни проучвания.

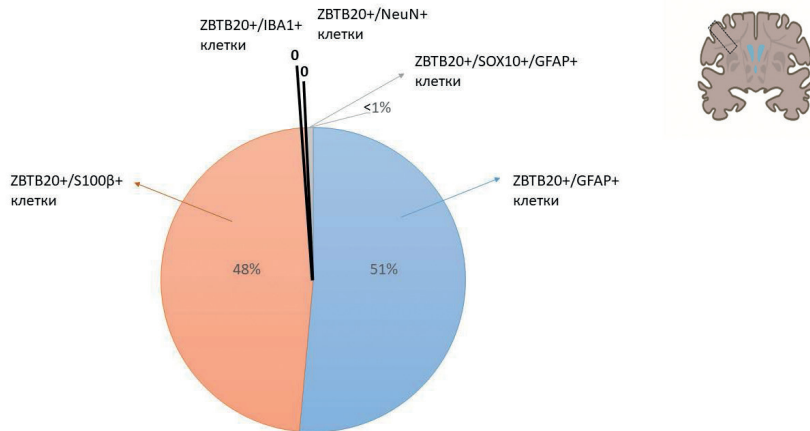
Подобно на Olig2, Sox10 е ген, важен за процеса на миелинизация. Също така и стимулира олигодендроцитната диференциация (Pingault et al. 2022). В хода на съвременно проучване на астроцити и OPCs по-

средством едноклетъчно секвениране от мозъчни тъкани на пациенти с епилепсия е наблюдавано трансформиране в генома на астроцитите: те се превръщат от зрял в незрял фенотип (подобни на прогениторни клетки астроцити). Тоест при епилепсия в огнищата на глиална пролиферация се установяват клетки в хибридно състояние между OPCs и реактивни астроцити. Тези хибридни клетки се позитивират както за GFAP, така и за OLIG2 (Pai et al. 2022). При гризачи е доказано наличието на единични случайно експресиращи Olig2 астроцити при физиологични условия (Wang et al. 2021). След исхемична увреда се наблюдава повишена експресия за Olig2 от реактивни GFAP-позитивни астроцити (Tatsumi et al. 2008). Има данни от ин витро проучвания, че астроцитите са способни да се трансдиференцират в OPCs (Liu et al. 2022). OPCs от своя страна могат да се превръщат в тип II астроцити (Hu et al. 2011). Въпреки че т. нар. хибридна глия, наблюдавана при епилепсия, има фенотип на реактивни астроцити и коекспресираща GFAP и OLIG2, тя също така е позитивна за допълнителен панел от OPCs маркери. Взимайки под внимание пластичността и трансформационния капацитет на OPCs, авторите не изключват някои от двойнопозитивните клетки (GFAP+/OLIG2+) да са реактивни OPCs (Pai et al. 2022).

Друго проучване демонстрира значението на ТФ Sox10 като регулатор на процеса на трансдиференциране на астроцити в OPCs ин vivo и ин витро. Също така значителна част от Sox10-позитивните клетки след трансформацията експресират и Olig2 (Liu et al. 2022). Известно от преди е, че ТФ Sox10 може да стимулира Olig2 експресията в невронални прогениторни клетки с цел подпомагане на олигодендроцитогенезата (Liu et al. 2007). Това предполага, че свръхекспресията на Sox10 в астроцити може да промотира свръхекспресия на Olig2 и да улесни по този начин репрограмизирането на астроцити в OPCs. Още повече, че свръхекспресия на Sox10 при увреда на гръбначния стълб е достатъчно условие астроцити да се трансформират в олигодендроцити (Ahn, Lee, and Kang 2006). Друго проучване също поддържа хипотезата, че астроцитите могат да се конвертират в клетки от OL линията само чрез експресията единствено на ТФ Sox10 (Julien et al. 2018). Експериментални постановки подкрепят идеята, че Sox10 в комбинация с други два ТФ могат да превърнат фибробласти от гризач в OPCs (Najm et al. 2013, Yang et al. 2013, Suzuki et al. 2017). В допълнение Sox10-позитивни

тивни клетки, изолирани в ранния постнатален период, се диференцират предимно в олигодендроцити (Suzuki et al. 2017).

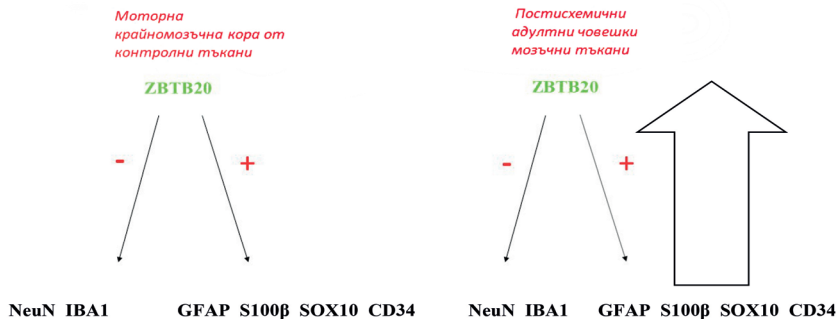
Настоящото проучване доказва за първи път, че в адултна човешка мозъчна тъкан от моторна кора има единични експресиращи SOX10 GFAP-позитивни глиални клетки (под 1% от цялата GFAP-експресираща клетъчна популация) (Фигура 6.1.). Не се откриха NeuN-позитивни постмитотични неврони, които да експресират ТФ SOX10. След исхемична мозъчна увреда броят на SOX10+/GFAP+ клетки значително нараства в областите на инфарктиране на мозъчната тъкан. Всички клетки, експресиращи SOX10, са GFAP-позитивни астроцити, но не всички GFAP-позитивни клетки са SOX10-позитивни. Освен че за първи път се демонстрира подобен количествен анализ на двойнопозитивните клетки в норма и след исхемична увреда при човек, се установи още, че 10% от SOX10+/GFAP+ клетките експресират също и ТФ ZBTB20 в постисхемичните тъкани. Колокализация за трите маркера при физиологични условия не беше установена. Наблюдаваните резултати са в съответствие с изложените по-горе съвременни експерименти върху човешки мозъчни тъкани с огнища на реактивна глиоза.



Фигура 6.1. Диаграмата демонстрира обобщен количествен анализ на молекулярните фенотипове клетки, установени в хода на настоящото проучване в моторна крайномозъчна кора на човек от контролните случаи (СМВ и прилежащо БМВ)

Основна задача остава да се определи (i) дали SOX10+/GFAP+ глиалните клетки представляват реактивни астроцити, които са претърпели геномна трансформация в резултат на увредата и са придобили фенотип на OPCs, или (ii) това са реактивни OPCs, които са пролиферирали и са се диференцирали до реактивни астроцити. Възможно ли е това да са реактивни олигодендроцити, които са приели астроглиален фенотип? На базата на общия произход на макроглията е основателно да се предположи, че наблюдаваният молекулярен субтип клетки (SOX10+/GFAP+/ ZBTB20+) след исхемична мозъчна увреда при човек заедно с класическите реактивни астроглиални клетки и OPCs всъщност представляват разновидност на една и съща клетъчна линия. На представената по-долу схема (Фигура 6.2.) са изобразени обобщаващите резултати от настоящия експеримент.

Експресия на ТФ ZBTB20 в мозъчна тъкан. Промени след исхемична мозъчна увреда



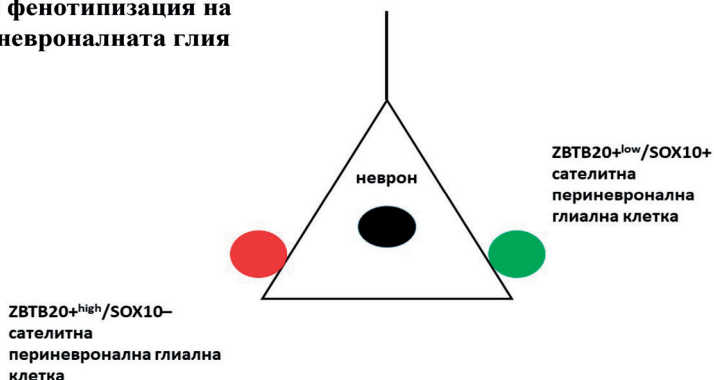
Фигура 6.2. Схематично обобщение на получените данни от настоящото изследване. ТФ ZBTB20 не се експресира в NeuN+ неврони и IBA1+ микроглия в контролните и в постисхемичните тъкани. ТФ ZBTB20 се експресира в GFAP+, S100β+, SOX10+ глиални клетки и в периваскуларната глия (CD34 маркира съдовия ендотел) в контролните и в постисхемичните тъкани. След исхемия количеството на ZBTB20-позитивните клетки, които експресират някои от тези маркери, нараства многократно

6.4. Класификация на периневронална сателитна глия

В хода на настоящия експеримент за първи път се установи, че част от ZBTB20-позитивните клетки в СМВ са с типична периневронална локализация както в тъкани без, така и в тъкани с исхемична увреда. Наблюдаваха се единични ZBTB20-позитивни клетки около невроните, както и клетки „дублети“, които експресираха ТФ ZBTB20 с висок (ZBTB20^{high+} клетки) или с нисък интензитет (ZBTB20^{low+} клетки). Т. нар. „сателитни“ глиални клетки представляват интерес, тъй като те влизат в преки интеракции с невроните и способстват за тяхното функциониране във физиологични условия и за тяхното съхранение в патологични условия. Въпреки това те са слабо проучени и до този момент не съществува установен молекулярен маркер, който да ги идентифицира (Hanani and Spray 2020). Това, което ние предлагаме и до този момент не е изследвано при човек, е ZBTB20 като маркер за оцветяване на периневроналната глия. Трябва да се отбележи, че не всички „сателитни“ клетки бяха ZBTB20-позитивни, т.е. ZBTB20-позитивните периневронални глиални клетки се очертават като клетъчна субпопулация на сателитната глия със специфично значение.

Това, което направи впечатление от анализа на имунофлуоресцентни изображения, е, че периневронални ZBTB20-позитивни клетки също експресираха SOX10 в СМВ от контролните и от постисхемичните мозъчни тъкани. При наблюдаваните ZBTB20-позитивни дублети около невроните само тези глиални клетки, които експресираха ZBTB20 с нисък интензитет (ZBTB20^{low+}клетки), бяха и SOX10-позитивни. Тоест сателитните ZBTB20+/SOX10+ периневронални глиални клетки бяха подразделени на два молекулярни подтипа според интензитета на експресия на ZBTB20: ZBTB20^{low+}/SOX10+ клетки и ZBTB20^{high+}/SOX10- клетки. Всеки един от тях вероятно има специфична роля в ЦНС, за установяването на която са необходими допълнителни проучвания (Фигура 6.3.).

Нова фенотипизация на периневроналната глия



Фигура 6.3. Молекулярна хетерогенност на периневроналната сателитна глия

Направата на класификация на клетки на базата на силата на експресия на ZBTB20 не е нов подход в невронауката. Дьорпнер и сътрудници, например, правят подобно субтипизиране на ZBTB20-позитивни клетки, като ги разделят на ZBTB20^{high}+ и ZBTB20^{low}+ в невrogenната зона SVZ (Дьорпнер, Herz, Bahr, et al. 2019). По подобен начин в настоящото изследване ние доказахме, че експресията на ZBTB20 в периневроналната сателитна глия може да се градира на висока (ZBTB20^{high}+ клетки) и ниска (ZBTB20^{low}+ клетки). Към момента периневроналната глия се счита за хомогенна клетъчна популация. Нашият детайлен анализ, обаче, успя да открие молекулярна сигнатура, разграничаваща периневроналната сателитна глия на базата на диференциална експресия на ТФ ZBTB20 и ТФ SOX10.

6.5. Влияние на различни параметри върху експресията на ТФ ZBTB20 в човешки постисхемични мозъчни тъкани

Представен е анализ на ZBTB20-позитивни клетки в адултни човешки постисхемични мозъчни тъкани с различна локализация на мозъчен инфаркт. Доказано е, че при човек точното разположение на исхемичната увреда не оказва влияние върху експресията на ZBTB20. Морфологичните изменения на тъканта след исхемична увреда, както и

клиничната документация позволиха случаите да бъдат групирани според давността на лезията. Този показател също не оказва значимо влияние върху броя ZBTB20-позитивни клетки в съответните случаи. Наличието на хеморагична компонента не оказва влияние върху средния общ брой ZBTB20-позитивни клетки в изследваните случаи спрямо средния общ брой ZBTB20-позитивни клетки за всички постисхемични тъкани. Потвърди се, че най-голямо количество ZBTB20-позитивни клетки има в сърцевината на исхемичната увреда. С отдалечаване от исхемичното огнище броят ZBTB20-позитивни клетки постепенно намаляваше. Тези клетки бяха най-малко в пенумбрата. Получените резултати потвърждават данните от подобни експериментални проучвания при гризачи.

6.6. Макроглиални клетъчни субпопулации – плеоморфизъм и комплексност

Настоящото проучване поддържа хипотезата за хетерогенността на глиалните клетки в човешката мозъчна тъкан. Въпреки наличието на редица различия между глиалните клетъчни субтипове при гризачи и при примати, в това число и при човек (описани в литературния обзор на дисертационния труд), се затвърждава и идеята за общи генетични пътища и механизми за функциониране на едни и същи клетъчни типове в различните животински видове. Допълнителни изследвания трябва да се направят, за да се разгледа по-подробно както морфологията, точната локализация и функцията на предложените нови субтипове клетки в зоната на инфаркт на мозъчната тъкан.

6.7. Технически трудности при анализ на препарати с инфаркт на мозъчната тъкан

Колекцията на свежа нервна тъкан за научни цели е изключително трудна задача. Тя трябва да се съобрази с редица етични и законови нормативи. Резултатите от подобно проучване биха били най-точни, ако се използва биопсичен материал. Исхемичният мозъчен инсулт обаче не е състояние, което позволява подобни интервенции. В такъв случай при употребата на некропсичен материал е необходимо ПМИ да бъде изключително кратък, дори под 12ч. Отново законовите регулации на аутопсионната дейност не винаги позволяват подобен подход. Обработ-

ката на тъканта следва да бъде експресна и при специфични лабораторни условия. Въпреки всички тези обстоятелства, които са променливи, то има редица фактори, които оказват своето влияние и са неизбежни: стил и начин на живот на съответния пациент, придружаващи заболявания, консумация на алкохол, медикаменти, тютюнопушене, наркотици и др.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящото изследване представяме експресията на ТФ ZBTB20 от клетки, локализирани в СМВ и в БМВ от човешка моторна кора и в постисхемични мозъчни тъкани. Наблюдава се специфично послойно разпределение на позитивните клетки в мозъчна кора от контролните случаи и са налични клетки с различен интензитет на експресия на ZBTB20. Сравнителният количествен анализ показва, че след исхемична мозъчна увреда количеството клетки, експресиращи ZBTB20, е значително по-голямо. Струпване на голям брой ZBTB20-позитивни клетки се регистрира също около увредени от исхемията кръвоносни съдове. Отчето се влиянието на различни параметри върху експресията на ТФ ZBTB20 в постисхемичните мозъчни тъкани и се заключи, че количеството ZBTB20-позитивни клетки зависи от разстоянието спрямо инфарктната сърцевина.

След имунофенотипизиране се установи, че ZBTB20-позитивните клетки не експресират невроналния маркер NeuN и маркера за микроглия IBA1. GFAP-позитивни и S100 β -позитивни астроцити в СМВ и в БМВ ко-експресират ZBTB20 и техното количество нараства право пропорционално в центъра на инфаркт на мозъчната тъкан. За първи път се демонстрира, че след исхемична мозъчна увреда количеството ZBTB20+/SOX10+ клетки нараства 15 пъти спрямо същото количество клетки в контролните случаи. Всички ZBTB20+/SOX10+ клетки са GFAP-позитивни и NeuN-негативни клетки.

За първи път се предлага класификация на периневроналната сателитна глия на базата на експресия на молекулярни маркери - установиха се два клетъчни подтипа: ZBTB20^{low}+/SOX10+ клетки и ZBTB20^{high}+/SOX10- клетки, които притежават висок интензитет на експресия на ZBTB20 и не експресират SOX10.

8. ИЗВОДИ

1. ТФ ZBTB20 се експресира в СМВ и в БМВ от крайномозъчна моторна кора на човек и в постисхемични мозъчни тъкани с различен по сила интензитет.
2. ТФ ZBTB20 не се експресира от NeuN-позитивни неврони в крайномозъчна моторна кора на човек и в постисхемични мозъчни тъкани.
3. ТФ ZBTB20 се експресира в GFAP-позитивни и в S100 β -позитивни астроцити в СМВ и в БМВ от крайномозъчна моторна кора на човек и от постисхемични мозъчни тъкани, но не всички GFAP-позитивни и S100 β -позитивни астроцити експресират ТФ ZBTB20.
4. ТФ ZBTB20 се експресира в единични SOX10-позитивни клетки (под 1%) в крайномозъчна кора на човек и в 15 пъти повече SOX10-позитивни клетки в постисхемични мозъчни тъкани.
5. ТФ ZBTB20 не се експресира от IBA1-позитивни микроглиални клетки в крайномозъчна моторна кора на човек и в постисхемични мозъчни тъкани.
6. ZBTB20-позитивните клетки са с 1.8 пъти повече в постисхемични мозъчни тъкани в сравнение с контролните тъкани.
7. Правопропорционално е нараснал броят на ZBTB20+/ GFAP+ и ZBTB20+/S100 β + клетки в зоната на мозъчен инфаркт, сравнено с контролните тъкани.
8. Струпване на голямо количество ZBTB20-позитивни клетки се наблюдава около увредени от исхемията кръвоносни съдове.
9. Всички ZBTB20+/ SOX10+ клетки в постисхемични мозъчни тъкани експресират протеина GFAP, но не всички GFAP-позитивни клетки коекспресират ZBTB20 и SOX10.
10. Периневроналните глиални клетки могат да бъдат класифицирани на база силата на експресия на ZBTB20 и наличието на ко-експресия на SOX10 в две подгрупи: ZBTB20low+/SOX10+ и ZBTB20high+/SOX10-.
11. Локализацията на мозъчния инфаркт, давността на лезията, наличието на хеморагична компонента в изследваните случаи не оказват влияние върху гъстотата на клетките, експресиращи ZBTB20. Количеството ZBTB20-позитивни клетки зависи от разстоянието спрямо инфарктната сърцевина, като е най-голямо в центъра на увредата.

9. СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

9.1. Оригинални резултати

1. За първи път се описва експресията на ТФ ZBTB20 в клетки от крайномозъчна кора в адултен човешки мозък (СМВ и БМВ, моторна кора).
2. За първи път се описва експресията на ТФ ZBTB20 в клетки от постисхемични адултни човешки мозъчни тъкани (СМВ и БМВ).
3. За първи път се излагат данни за молекулярна хетерогенност на периневроналната сателитна глия на базата на експресията на ТФ ZBTB20.
4. За първи път се описва експресията на ТФ SOX10 в клетки от постисхемични адултни човешки мозъчни тъкани.
5. За първи път се описва ко-експресията на ТФ ZBTB20, ТФ SOX10 и протеина GFAP в клетки от постисхемични адултни човешки мозъчни тъкани.
6. За първи път се документира детайлно постисхемичната глиал-на пролиферация в адултен човешки мозък.

9.2. Потвърдителни резултати

1. Потвърждава се, че експресията на ТФ ZBTB20 е реактивна на исхемия, както е наблюдавано при гризачи и при примати (маймуни макак).
2. Потвърждават се тенденциите на експресия на ТФ ZBTB20, наблюдавани в модел на исхемия на ЦНС при гризачи.
3. Потвърждават се тенденциите на ко-експресия на ТФ SOX10 и GFAP, наблюдавани в човешки мозъчни тъкани след увреда.

10. ПУБЛИКАЦИИ, ДОКЛАДИ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

10.1. Публикации

1. **Виктория Михайлова**, Станислав Морфов, Искрен Великов, Радослав Спасов, Ирина И. Стоянова, Антон Б. Тончев. „Астроцитна хетерогенност в норма и след мозъчна увреда“. Варненски медицински форум, 2023
2. **Виктория Михайлова**, Станислав Морфов, Искрен Великов, Радослав Спасов, Ирина И. Стоянова, Антон Б. Тончев. „Роля на микроглията при исхемичен мозъчен инсулт“. Варненски медицински форум, 2023
3. Искрен Б. Великов, Радослав Хр. Спасов, Станислав Морфов, **Виктория Михайлова**, Ирина И. Стоянова, Антон Б. Тончев. „Постнатално развитие на малък мозък при мишка“. Варненски медицински форум, 2023

10.2. Научни доклади

10.2.1. *Национални*

1. **Mihailova V**, Bukovinov D, Morfov S, Pavlov S, Stoykova A*, Dppner T**, Stoyanova I, Tonchev A. “Effect of stroke on the expression of astrocyte marker GFAP in the brain of mice with inactivation of the transcription factor Pax6”. VII National Conference “Morphological Days”, June 8 – 10, 2018, Sofia, Bulgaria.
2. **Mihailova V**, Stoyanova II, Döppner T, Tonchev AB. “Effect of stroke on the expression of astrocyte marker GFAP in the brain of mice with activated transcription factor Pax6“. National Congress of BAS, May 31 – June 2, 2019, Stara Zagora, Bulgaria

10.2.2. С международно участие

1. X International Symposium on Clinical Anatomy, October 6–8, 2016, Varna, Bulgaria
2. Morfov S, **Mihailova V**, Stoyanova II, Döppner T, Tonchev AB. „Effect of stroke on gliogenesis in the brain of mutant mice with overexpressed transcription factor pax6”. Humboldt Kolleg “Science without Borders: Alexander von Humboldts Concept in Todays World”, 8–21 Sept, 2019, Varna, Bulgaria
3. **Mihailova VD**, Morfov SR, Tonchev AB, Stoyanova II. „Expression of transcription factor ZBTB20 in the cerebral cortex of the human brain”. XI International symposium on clinical anatomy, 2-4 October, 2020, Varna, Bulgaria
4. Humboldt Kolleg „Sciences in dialogue and monologue”, 30.06.-03.07., 2022, Arbanassi, Bulgaria

10.3. Научни проекти

1. „Постисхемична невропротекция: роля на грелина и транскрипционния фактор Pax6“, (вх. No ДН13/10 от 2017 г.), Фонд „НИ” – национален проект.
2. „Астроцитна хетерогенност и експресия на транскрипционен фактор ZBTB20 в глиални субпопулации на човешки теленецфалон“, Фонд „Наука” на МУ – Варна, конкурсна сесия 2019г.

11. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на проф. д-р Антон Тончев за възможностите за професионална реализация и развитие, за подкрепата и помощта, които ми оказва.

Благодаря на научния си ръководител доц. д-р Ирина Стоянова – ван дер Лаан за безценните насоки, съвети и техническата помощ, които ми оказва. Благодаря на научния си консултант проф. д-р Петър Генев за подкрепата.

Благодаря на лаборантите Велина Кеновска, Неранза Колева, Елена Боева за извършване на лабораторната дейност във връзка с дисертационния труд и за приятелската подкрепа.

Благодаря на Лора Велева и Андон Младенов, че сканираха микроскопските препарати във връзка с настоящото проучване.

Благодаря на Александра Бакалова за помощта с графичното оформление на създадените фигури във връзка с настоящия дисертационен труд.

Благодаря на колегите от катедрата по „Анатомия и клетъчна биология“ и от катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ за спокойната работна среда, приятелското отношение, моралната подкрепа и помощта и за труда по извършената аутопсионна дейност

Благодаря на техническите ни сътрудници Галина Ангелова, Ива Даскалова, Валентина Колева, които безпроблемно координираха организационната, административна и учебна дейност по време на работа.

Благодаря на семейството, приятелите и колегите си за обичта и вярата в мен.