

Медицински университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - гр. Варна
Факултет по Медицина
Катедра по Анатомия и клетъчна биология

Ръководител: Проф. Д-р Ирина Стоянова – ван Дер Лаан, дм

Искрен Боянов Великов

**Роля на транскрипционния фактор Zbtb20 в
развитието на малък мозък**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Варна
2025

Медицински университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - гр. Варна
Факултет по Медицина
Катедра по Анатомия и клетъчна биология

Ръководител: Проф. Д-р Ирина Стоянова – ван Дер Лаан, дм

Искрен Боянов Великов

**Роля на транскрипционния фактор Zbtb20 в
развитието на малък мозък**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна област: Медицина, шифър 07.01.00

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

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
Проф. Д-р Ирина Иванова Стоянова – ван Дер Лаан д.м.

Варна
2025

Докторантът работи като асистент към катедрата по „Анатомия и клетъчна биология“ на Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов – Варна“. Експерименталната работа по този труд е извършена под ръководството на проф. д-р Ирина Стоянова – ван Дер Лаан д.м. в Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов – Варна“. Дисертационният труд е от областта на специалността „Анатомия, хистология и цитология“ – шифър 03.01.02. Представен е на 161 страници и е онагледен с 97 фигури. Цитирани са 264 литературни източника. Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедрата по Анатомия и клетъчна биология при Медицински Университет – Варна на 26 март 2025 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Публичната защита на Дисертационния труд ще се състои на 25 юни 2025 г. от ч. чрез видеоконферентна връзка.

Състав на научното жури:

Външни членове:

1. Проф. д-р Стефан Тодоров Сивков, д.м.
2. Проф. д-р Ивета Антонова Коева, дм.
3. Проф. Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова, д.б.

Резервен външен член:

Проф. д-р Николай Димитров Димитров, д.м.

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.
2. Доц. д-р Меглена Валдемарова Ангелова, д.м.

Резервен вътрешен член:

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

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД

2. ХИПОТЕЗИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Опитни животни и подготовка на тъканите

4.2. Изготвяне на срези от малък мозък

4.3. Имунофлуоресценция:

4.4. Първични и вторични антители:

4.5. Микроскопиране и статистическа обработка:

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Нормална експресия на *Zbtb20* в развиващия се малък мозък на шестнадесети ембрионален ден.

5.2. Нормална експресия на *Zbtb20* на тридесети постнатален ден (P30).

5.3. Развитие на малкомозъчните листа (малкомозъчна фолиация) в постнаталния живот.

5.4. Сравнителна характеристика на площта на слоевете на малкомозъчната кора при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.5. Изследване с невроналния маркер *Neun* при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.6. Изследване количеството и разпределението на клетките на Пуркиние при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.7. Количествен анализ на униполярните четковидни неврони при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.8. Количествен анализ на клетките на Голджи – тип 2 при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.9. Количествен анализ на пролифериращите клетки в малък мозък при индивиди от див тип (*Zbtb20^{+/+}*) и при хомозиготни мутанти (*Zbtb20^{-/-}*) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

5.10. Количествен анализ на астроцитите в малък мозък при индивиди от див тип ($Zbtb20^{+/+}$) и при хомозиготни мутанти ($Zbtb20^{-/-}$) в постнаталния живот (P4, P8, P12).

6. ИЗВОДИ

7. ОБСЪЖДАНЕ

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

9. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

10. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

11. БЛАГОДАРНОСТИ

Използвани съкращения

aCasp3 – активирана каспаза 3

Barhl1 – BarH – like Homeobox1

BG – Бергманова глия

BrdU - bromodeoxyuridine

DCN – дълбоки малкомозъчни ядра

DCX – Doublecortin

EGL – външен зърнест слой

GABA- гама-амино-маслена киселина

GCPs – прекурсори на зърнестите неврони

GCs – зърнести неврони

GFAP – глиален фибриларен кисел протеин

IGL – вътрешен зърнест слой

ML – молекулярен слой

Pax2 – Paired box protein Pax2

Pax6 – Paired box protein Pax6

PBS – фосфатен буфер

RL – ромбична устна

RMS – рострален миграционен поток

SGZ – субгрануларна зона

UBC – униполярни четковидни неврони

VZ – вентрикуларна зона

WM – бяло мозъчно вещество

Zbtb20 - zinc finger and BTB-domain containing 20

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

ЦНС – централна нервна система

1. Увод

Нервната система представлява съвкупност от структури, осъществяващи интеграцията и адаптацията на организма. По топографския принцип тя се дели на централна и периферна. Основната тъкан, която изгражда структурите на нервната система е нервната тъкан. Изградена е от два клетъчни компонента: нервни клетки, *neurocyti*, и невроглия, *neuroglia*. Основна структурна и функционална единица е невронът- *neuronum*. Този термин е въведен за първи път от Валдайер (Waldeyer) през 1891 г.

Нервната система се развива от нервната тръба. От нейната предна разширена част (зачатък на главния мозък) чрез две прищъпвания се формират три първични мозъчни мехурчета: предно- *prosencephalon*, средно- *mesencephalon*, и задно – *rhombencephalon*. По-късно предното мехурче се разделя на две части- краен мозък (*telencephalon*) и междинен мозък (*diencephalon*). Задното мехурче се разделя на: заден мозък- *metencephalon*, и продълговат мозък- *medulla oblongata*. Задният мозък дава началото на моста- *pons*, и на малкия мозък- *cerebellum*. Органогенезата на нервната система се съпровожда и с хистогенеза на нервните елементи. Процесът на образуване на нови функционално активни неврони от стволови или прогениторни клетки се нарича неврогенеза.

Малкият мозък има три основни функции: поддържане на равновесното положение на тялото в пространството, поддържане на мускулния тонус и координация на волевите движения. В малкия мозък се разграничават две странични части: малкомозъчни полукълба - *hemispheria cerebelli* и разположена между тях малка, изостанала в развитието си част - червей (*vermis*). Повърхността на малкия мозък е набраздена от дълбоки цепки – *fissurae cerebelli*, които разделят малкомозъчните листа - *folia cerebelli*. Филогенетично и функционално малкият мозък се разделя на преден, заден и флокулонодуларен дял. Също така се подразделя на три части: стара - *paleocerebellum*, древна - *archicerebellum*, нова – *neocerebellum*. Във всяка от тези области действат различни молекулярни механизми на генна експресия, което води до функционални различия (Chen, Hanson et al. 1996; Sillitoe and Joyner 2007). Използвайки критериите на Larsell за вермиса, малкият мозък на всички бозайници може да бъде разделен на десет основни делчета. Всеки от тях по-нататък се подразделя на вторично и третично подделче (Larsell 1970). Малкият мозък е изграден от: кора (*cortex cerebelli*), централно разположено бяло вещество - *corpus medullare* и ядра,

лежащи в бялото вещество. Малкомозъчната кора е хистологично хомогенна и разделена на три ясно разграничими клетъчни слоя – молекулярен слой, слой на клетките на Пуркиние и зърнест слой. Тези слоеве лежат над сърцевина от бяло мозъчно вещество и малкомозъчните ядра (DCN). Бялото вещество е изградено от снопове аксони, изграждащи входящи и изходящи пътища.

Съвременните молекулярни, генетични, физиологични и анатомични методи непрекъснато се развиват. Въпреки това множество процеси, свързани с неврогенезата, невроналната миграция и формирането на синапсите в развиващия се мозък остават неизяснени. Установяването на механизмите на ембрионалното развитие на мозъка е предизвикателство за съвременната невронаука. Смутенията в тези механизми на генно ниво водят до мозъчни увреждания. Тяхното изясняване ще допринесе за усъвършенстване на терапевтичните подходи в клиничните невронауки. Настоящото изследване има за цел да внесе повече яснота за ролята на транскрипционните фактори и по-специално *Zbtb20* в развитието на малкия мозък.

2. Хипотези на Дисертационния труд

1. Транскрипционният фактор *Zbtb20* повлиява развитието на малкия мозък при мишка.
2. Транскрипционният фактор *Zbtb20* не повлиява развитието на малкия мозък при мишка.

3. Цел и задачи на изследването:

При провеждането на нашето изследване си поставихме за цел:

1. Да установим ролята на транскрипционния фактор Zbtb20 в развитието на невроналните и невроглиалните клетъчни популации.
2. Да се установи ролята на Zbtb20 в процеса на малкомозъчна фолиация.

Поставихме си следните задачи:

1. Да се проследи нормалната експресия на Zbtb20 в малкия мозък на мишки от див тип на различните възрастови преиоди (E16 и P30).
2. Да се измери площта на различните слоеве – външен зърнест, молекулярен, вътрешен зърнест, слой на Пуркиние на трите възрастови периода – P4, P8 и P12 при индивиди от див тип и при мутанти.
3. Да се установи клетъчната популация от астроцити и бергманова глия на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти, ползвайки GFAP- антитяло.
4. Да се установи клетъчната популация от клетки на Пуркиние на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти чрез използването на Calbindin- антитяло.
5. Да се направи количествен и качествен анализ на Neun⁺ клетки на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти.
6. Да се направи количествен и качествен анализ на Calretinin⁺ клетки на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти.
7. Да се проследи пролиферативния потенциал на клетките на развиващия се малък мозък, използвайки маркера Ki-67.
8. Да се направи количествен и качествен анализ на Tbr2⁺ клетки на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти.
9. Да се направи количествен и качествен анализ на Zbtb20⁺ клетки на P4, P8 и P12 при контроли и мутанти.

4. Материал и методи

Опитни животни и подготовка на тъканите:

За целта на нашето изследване се ползват Zbtb20 мутантни мишки. Изследванията са проведени в съответствие с Немския Закон за защита на животните, след одобрение на експериментите от Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) / Oldenburg, договор № 33.9-42502-04-11 / 0622 от 07.12.2011. Експериментите са завършени преди 1 януари 2013 г. Хомозиготни мишки се генерират от кръстосване на хетерозиготни животни, което позволява директно сравнение на моделите на експресия на гени между хомозиготни контроли (+/+), хетерозиготни мутанти (+/-) и хомозиготни мутанти (-/-). За анализа мишките бяха умъртвени чрез цервикална дислокация или чрез вдишване на CO₂. На нокаутираните (KO) Zbtb20 мишки липсва функционално важният VTB / POZ домейн на протеина, както и първият от петте цинкови пръста, които са заменени с касета lacZ-неомицин.

Използвани бяха и мишки от див тип на шестнадесети ембрионален ден, както и на тридесети постнатален ден. Тези опитни животни бяха предоставени в колаборация с Института по Микробиология на БАН. Протоколът е № 392 от 21. 04. 2024 г.

Бактерии:

Бяха използвани няколко вида на *E. coli*. За молекулярно клониране се ползва DH5 α . HL1-Blue (MRA) (Stratagene) бяха ползвани като гостоприемник за бактериофагите.

Стандартни разтвори:

Phosphate- buffered saline (PBS); Paraformaldehyde (PFA); Tris EDTA (TE).

Изолиране на плазмидна ДНК от клетки на *E. coli*:

Плазмидна ДНК (10-20 μ m) беше изолирана от 2 ml бактериални култури чрез използване на Miniprep комплект (Qiagen) или чрез метода алкално лизиране.

Генериране на Zbtb20 (-/-) мутанти чрез рекомбиниране:

За генериране на мишки с дефицит на Zbtb20 се създава вектор, използващ метод, наречен рекомбинация (рекомбинация, медирана от генно инженерство).

Изготвяне на срези от малък мозък:

Бяха използвани общо 36 експериментални животни. От тях 6- Zbtb20^{-/-} и 6- Zbtb20^{+/+} на P4; 6- Zbtb20^{-/-} и 6- Zbtb20^{+/+} на P8; 6- Zbtb20^{-/-} и 6- Zbtb20^{+/+} на P12. Маркирането с нуклеотидния аналог bromodeoxyuridine (BrdU) става посредством интраперитонеалното му инжектиране съответно на E10; E12,5; E14,5. Дозирането е 40 mg/kg. След умъртвяване на опитните животни, мозъкът бе изваден от черепната кухина и малкият мозък беше отделен от останалата част на мозъка. След това тъканта бе поставена в студен буфер на Кребс. Тъканните блокчета бяха поставени в 4% разтвор на агароза. След това бяха поставени в 4% разтвор на параформалдехид с цел фиксация за 1 час. Фиксираната тъкан след това беше изплакната с PBS, поставена в разтвор на сукроза и впоследствие замръзена. Направени бяха срези на криостат с дебелина 10 μ m. Антигенно възстановяване се осъществява чрез нагряване в микровълнова печка (800 W, 3 пъти, по 5 минути всяка) в цитратен буфер (pH 6,0). След това срезите се промиват и блокират за 1 h в блокиращ разтвор, съдържащ нормален серум. Първичните антитела се инкубират една нощ при 4°C в блокиращия разтвор. След промиване срезите се инкубират с видоспецифични вторични антитела от серията Alexa (Invitrogen) в блокиращ разтвор за 2 h при стайна температура (RT), промиват се отново и се включват с включваща среда Vectashield (Vector Labs), съдържаща DAPI.

Имунофлуоресценция:

След изплакване в разтвор на PBS, тъканните срези бяха поставени в разтвор на натриев цитрат, pH 6,0 за антигенно възстановяване. Проведе се инкубация с първични антитела, а след това и с вторични. Последва оцветяване с 4',6'- диамино- 2- фенилиндол (DAPI).

Първични и вторични антитела:

Използвахме следните първични антитела и съответните разреждания: Заешки моноклонални антитела: anti- calbindin (1:500) от Sigma; anti- calretinin (1:400) от Chemicon; anti- Ki-67 (1:100) от Lab Vision (thermoscientific); anti- Pax2 (1:100) от Invitrogen; анти-каспаза-3 (1: 200) от Santa Cruz; anti-Ki67 (1: 100) от Dako; anti-NeuN (1: 100) от Millipore; анти-Pax6 (1: 300) от Covance; анти-Pax6 (1: 100) от Invitrogen; анти-Tbr1 (1: 300) от Abcam; анти-Tbr2 (1: 200) от Chemicon. Козе моноклонални антитела: anti- doublecortin (1:500) от

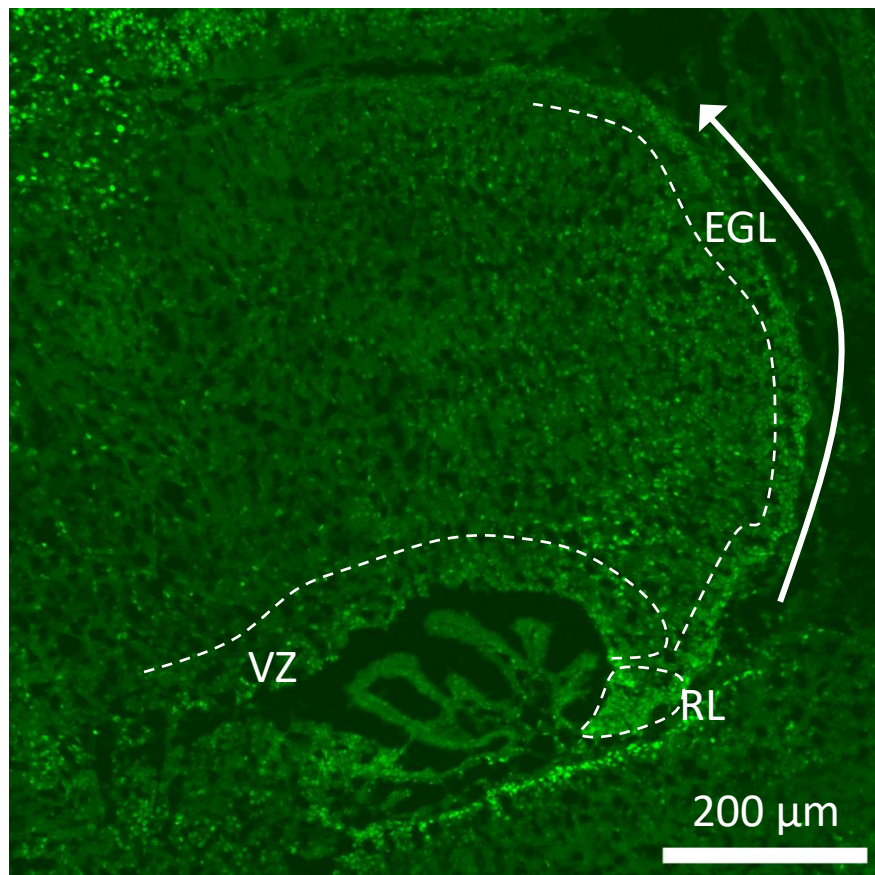
Santa Cruz. Пилешки моноклонални антитела: anti- GFAP (1:400) от Thermo Scientific. Вторични антитела (сериите на Alexa; 1:200) от Invitrogen.

Микроскопиране и статистическа обработка:

Наблюдението на образите и тяхното заснемане се извърши с помощта на флуоресцентен микроскоп “Zeiss” в Катедра по „Анатомия и клетъчна биология“ на МУ- гр. Варна. Използвани са обективи с увеличения: x5, x10, x20, x40. Обработката на образите, измерването на площите и броенето на клетки бе извършено с помощта на софтуерния продукт Image J (Fiji). Ползвахме функцията ROI. Статистическата обработка на данните бе направена с помощта на програмата Microsoft Excel. Статистическите различия между проучваните групи бяха установени чрез функциите: стандартно отклонение (ST Dev), както и Student`s T-test. Възприемаме за статистически значима разликата между контроли и мутанти, ако при T-test - $p < 0,05$.

Резултати

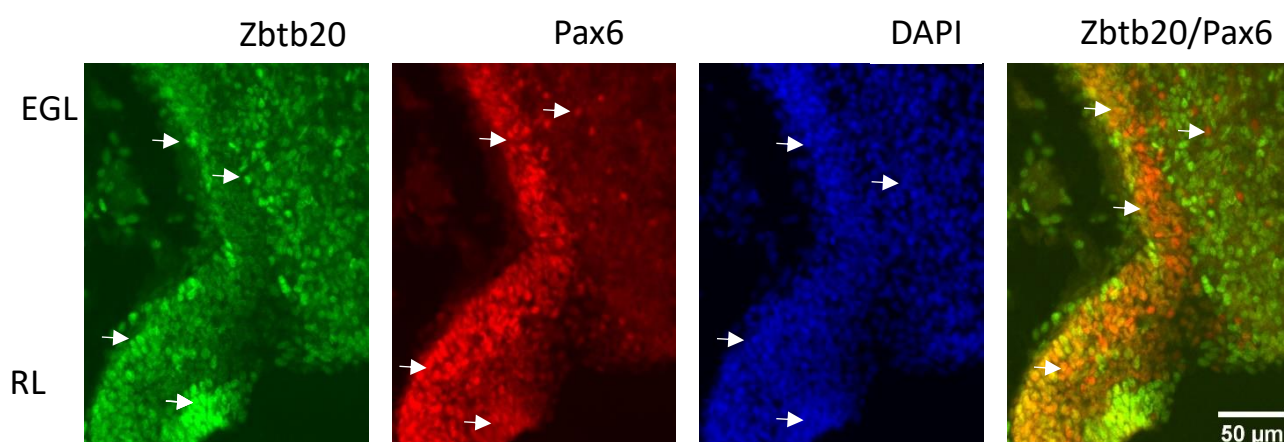
За установяване на нормалната експресия на Zbtb20 в малкия мозък проведохме имунофлуоресцентно оцветяване със Zbtb20 на шестнадесети ембрионален ден (E16) при мишки - контроли. Установяваме експресия в областта на малкомозъчния примордиум – ромбичната устна (RL). Тя е и прогениторна зона за неврони и глия (фиг. 1).



Фиг. 1 – Представена е ромбичната устна (RL), където се разполага зачатъкът на малкия мозък. Също така наблюдаваме вентрикуларната зона (VZ) и външния зърнест слой (EGL). Увел. x5. Снимката е представена със съгласието на Д-р Димо Стоянов д.м. и Д-р Лора Велева.

На шестнадесети ембрионален ден проследихме експресията на маркерите Zbtb20 и Pax6. Изследвахме четири зони от развиващия се мозък при индивиди от див тип. Това са: външна

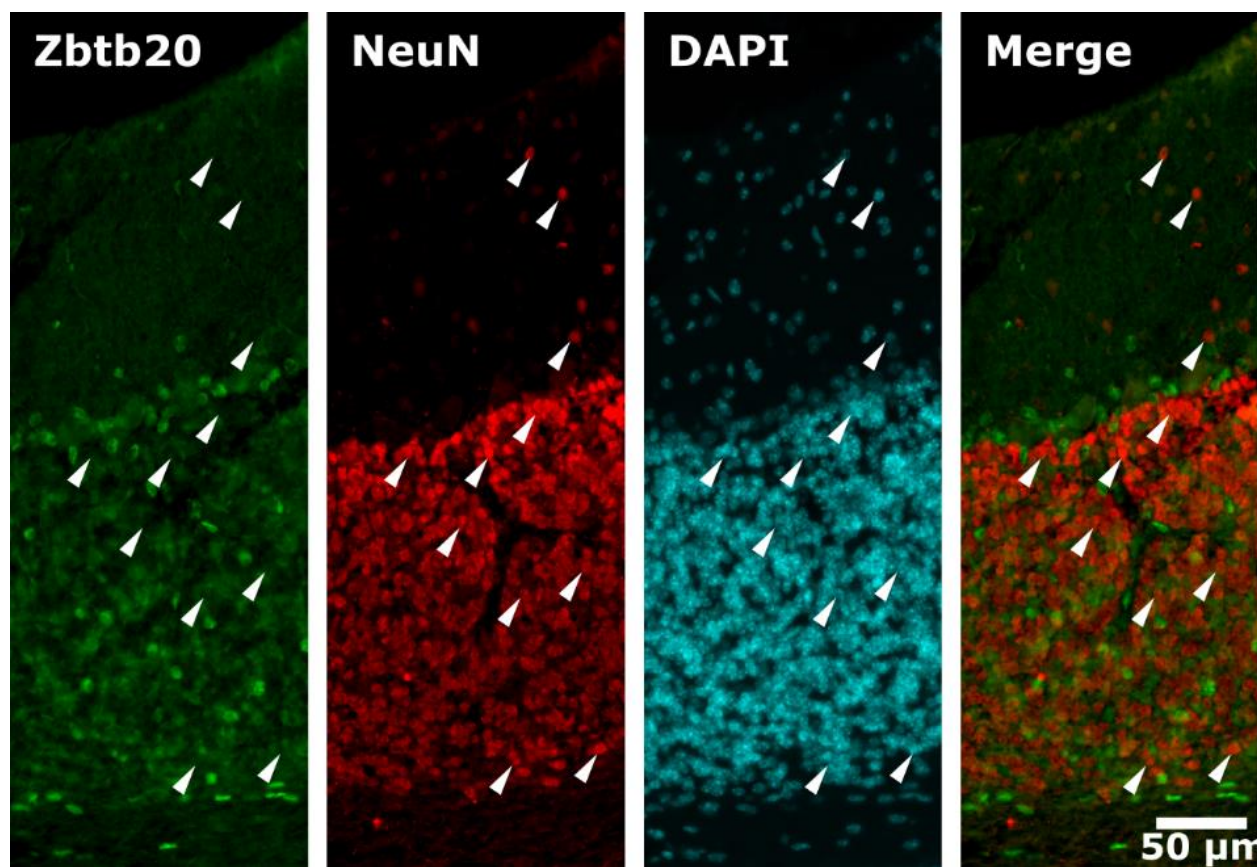
ромбична устна (ERL), вътрешна ромбична устна (IRL), външен зърнест слой (EGL) и плоча на клетките на Пуркиние (PCP). Във външната ромбична устна установихме 98 Zbtb20 – имунореактивни клетки. От тях 28 са имунореактивни и за маркера Pax6, т.е. 29,08% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Zbtb20⁺ клетки. В същата зона открихме 114 Pax6⁺ клетки. От тях 28 са имунореактивни и за маркера Zbtb20, т.е. 24,89% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Pax6⁺ клетки. Във вътрешната ромбична устна установихме 77 Zbtb20 – имунореактивни клетки. От тях 17 са имунореактивни и за маркера Pax6, т.е. 22,6% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Zbtb20⁺ клетки. В същата зона открихме 70 Pax6⁺ клетки. От тях 17 са имунореактивни и за маркера Zbtb20, т.е. 25% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Pax6⁺ клетки. Във външния зърнест слой установихме 166 Zbtb20 – имунореактивни клетки. От тях 22 са имунореактивни и за маркера Pax6, т.е. 13,51% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Zbtb20⁺ клетки. В същата зона открихме 126 Pax6⁺ клетки. От тях 22 са имунореактивни и за маркера Zbtb20, т.е. 17,79% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Pax6⁺ клетки. В плочата от клетки на Пуркиние установихме 165 Zbtb20 – имунореактивни клетки. От тях 6 са имунореактивни и за маркера Pax6, т.е. 3,63% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Zbtb20⁺ клетки. В същата зона открихме 187 Pax6⁺ клетки. От тях 6 са имунореактивни и за маркера Zbtb20, т.е. 3,2% двойнопозитивни клетки (Zbtb20⁺/Pax6⁺) от всички Pax6⁺ клетки (фиг. 2).



Фиг. 2 – Флуоресцентни микрофотографии, представящи експресията на Zbtb20 и Pax6 (стрелки) в ромбичната устна и външния зърнест слой на E16: А) и В) илюстрират експресията съответно само на Zbtb20 и Pax6; С) избирателно маркиране на ядрата с

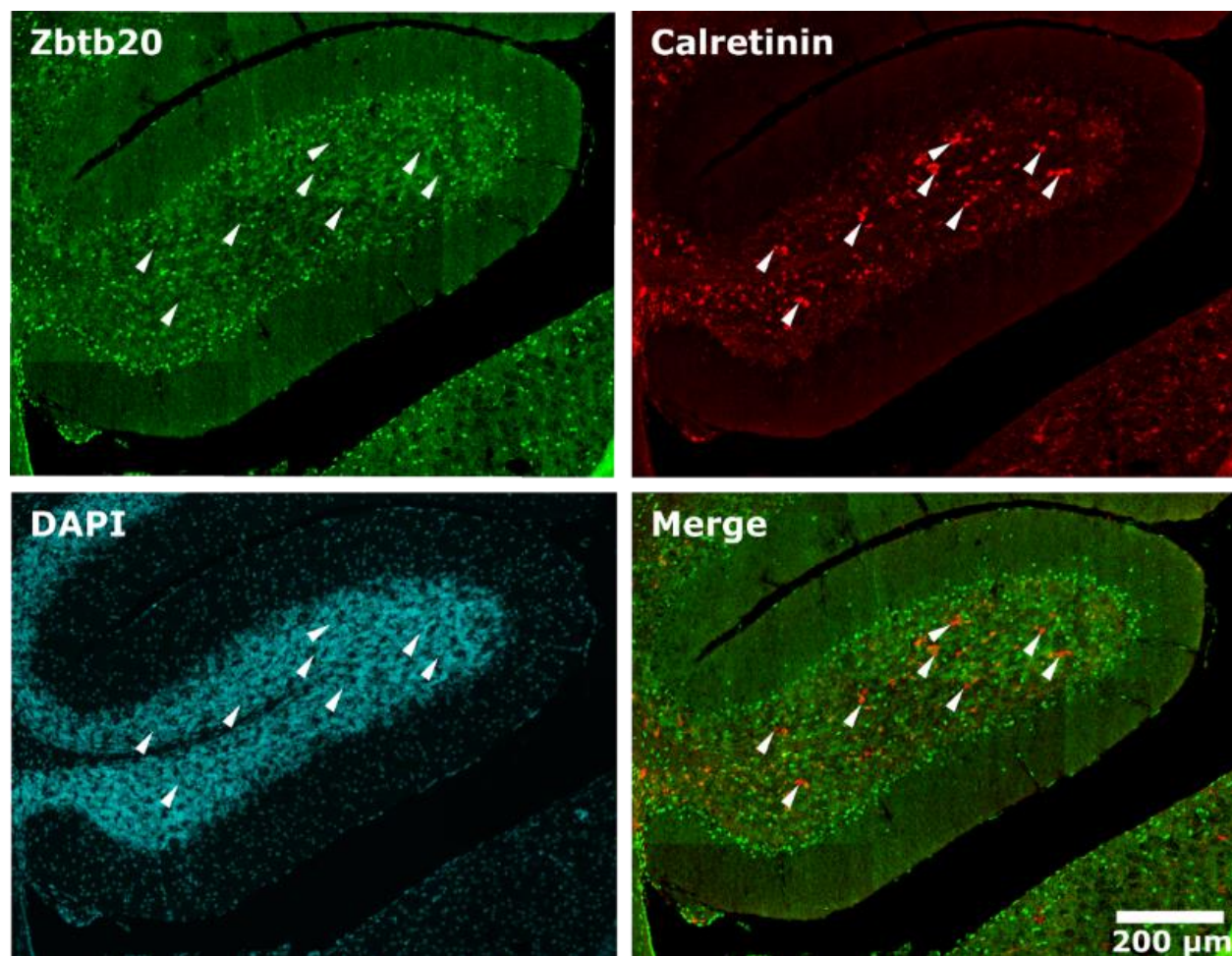
DAPI, което дава възможност да се определи общият брой клетки в изследваната зона; D) образът е получен от наслагването на A и B, в резултат на което двойно белязаните клетки се оцветяват в оранжево (стрелки). Увел. $\times 10$. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване на колокализацията на Zbtb20⁺ и NeuN⁺ клетки изследвахме малък мозък при зрели индивиди от див тип на тридесети постнатален ден (P30). Приложихме и оцветяване с DAPI. Не установяваме двойно позитивни нервни клетки (NeuN⁺ и Zbtb20⁺) в малкомозъчната кора. Това означава, че при зрели индивиди невроните не експресират Zbtb20 (фиг. 3).



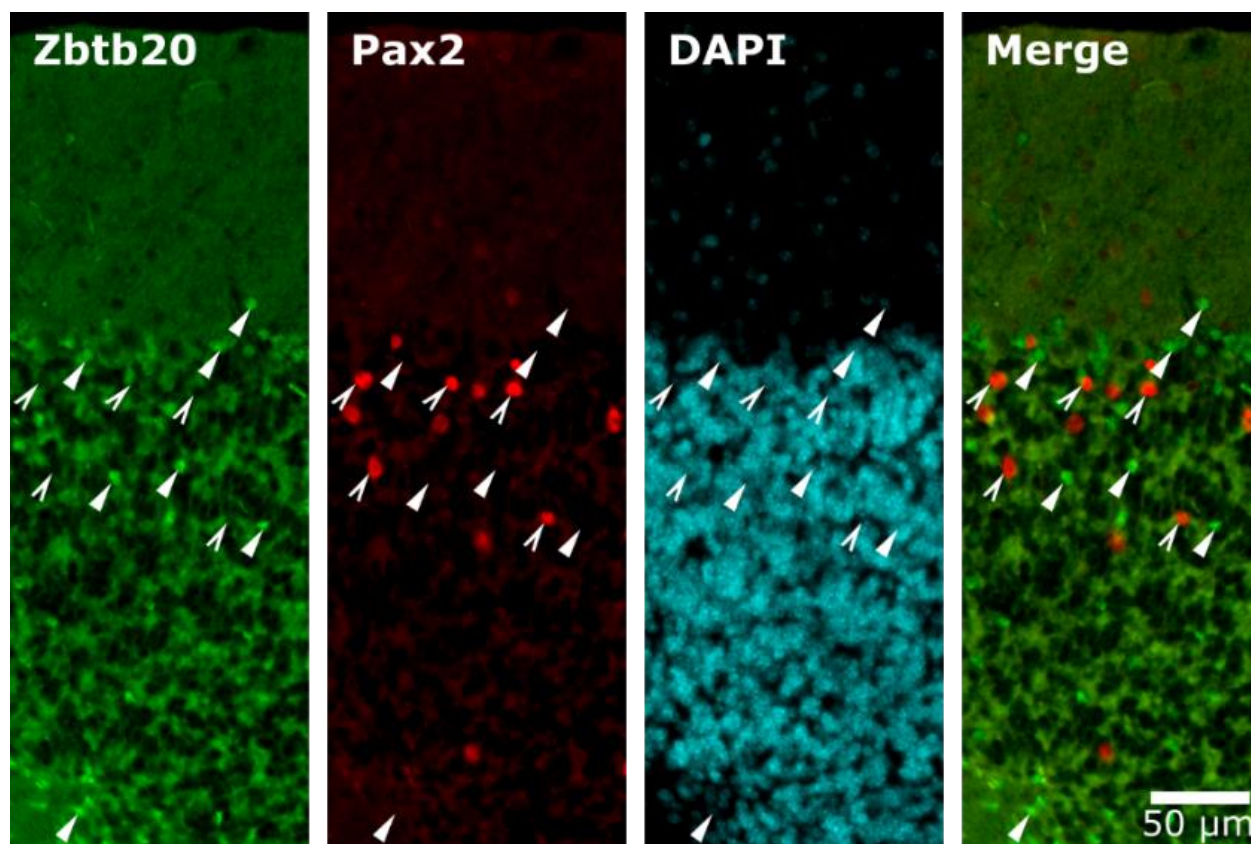
Фиг. 3 - Тъмнополева микрофотография илюстрираща наличие на NeuN⁺ клетки (в червено) и Zbtb20⁺ клетки (в зелено). Наслагването на двата образа показва, че в кората на малкия мозък няма двойно белязани неврони. С DAPI са оцветени всички клетъчни ядра. Увел. $\times 5$. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване на колокализацията на Zbtb20⁺ и Calretinin⁺ клетки изследвахме малък мозък при зрели индивиди от див тип на P30. Приложихме оцветяване и с DAPI. Клетките, които са позитивни за Zbtb20 не са имунопозитивни за Calretinin. Не установяваме двойно позитивни униполярни четковидни неврони (Zbtb20⁺ и Calretinin⁺) (фиг. 4).



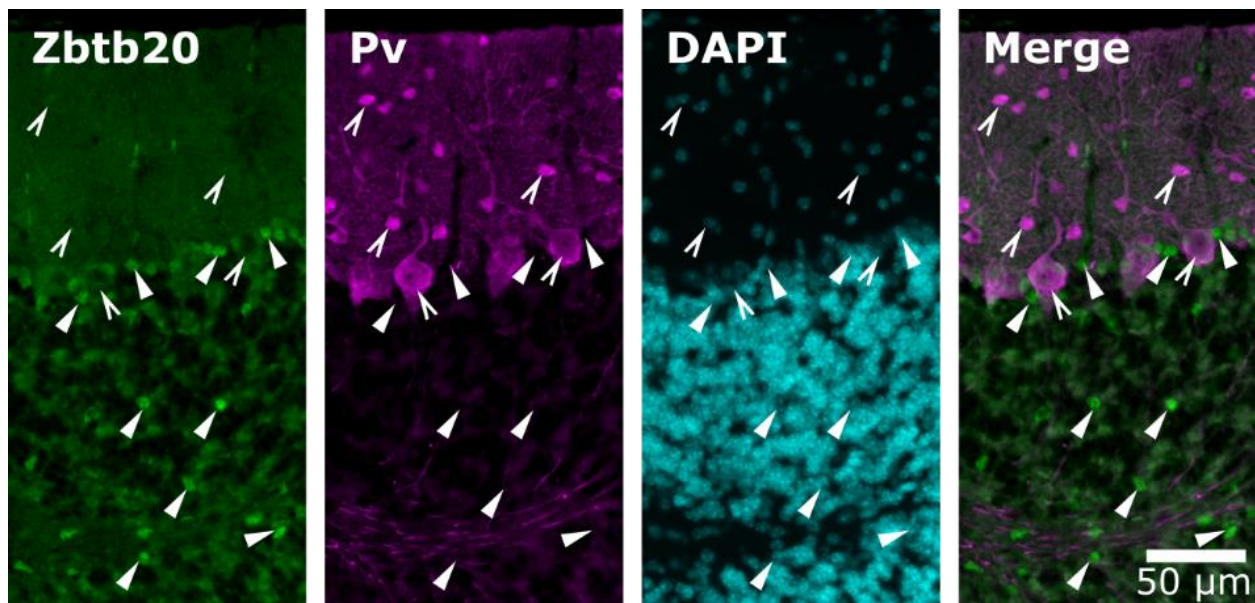
Фиг. 4 - Флуоресцентна микрофотография на малкомозъчна кора от мишка див тип на P30. Zbtb20⁺ невроните са маркирани в зелено, а униполярните четковидни неврони, визуализирани с техния маркер Calretinin⁺, са представени в червено. Стрелките и в трите снимки сочат едни и същи четковидни клетки. От наслагването на двата образа (merge), визуализиращи маркерите, се вижда, че Zbtb20 не се експресира в тази невронна популация. Ядрата на всички клетки са оцветени в синьо с DAPI. Увеличение x5. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване на колокализацията на $Zbtb20^{+}$ и $Pax2^{+}$ клетки изследвахме кората на малък мозък при зрели индивиди от див тип на P30. Приложихме оцветяване и с DAPI. Клетките, които са позитивни за $Zbtb20$ не са имунопозитивни за $Pax2$. Не установяваме двойно позитивни клетки на Голджи от втори тип ($Zbtb20^{+}$ и $Pax2^{+}$) (фиг. 5).



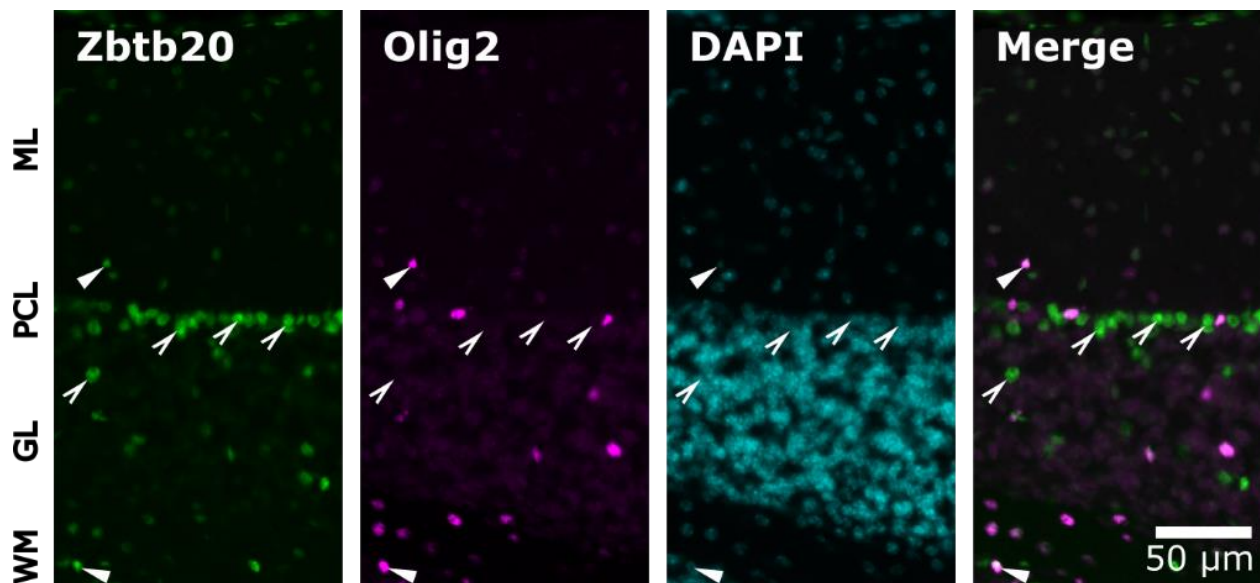
Фиг. 5 - $Zbtb20^{+}$ (в зелено, обозначени с пълтни стрелки) и $Pax2^{+}$ клетки (в червено, обозначени с отворени стрелки) на P30. Наслагването на двата образа ясно показва, че няма ко-локализация на двата транскрипционни маркера в клетките на Голджи тип-2 (Merge). Увел. x5. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване на колокализацията на $Zbtb20^{+}$ и $Parvalbumin^{+}$ клетки изследвахме малък мозък при зрели индивиди от див тип на P30. Приложихме оцветяване и с DAPI. Клетките, които са позитивни за $Zbtb20$ не са имунопозитивни за $Parvalbumin$. Не установяваме двойно позитивни клетки на Пуркиние ($Zbtb20^{+}$ и $Parvalbumin^{+}$) (фиг. 6).



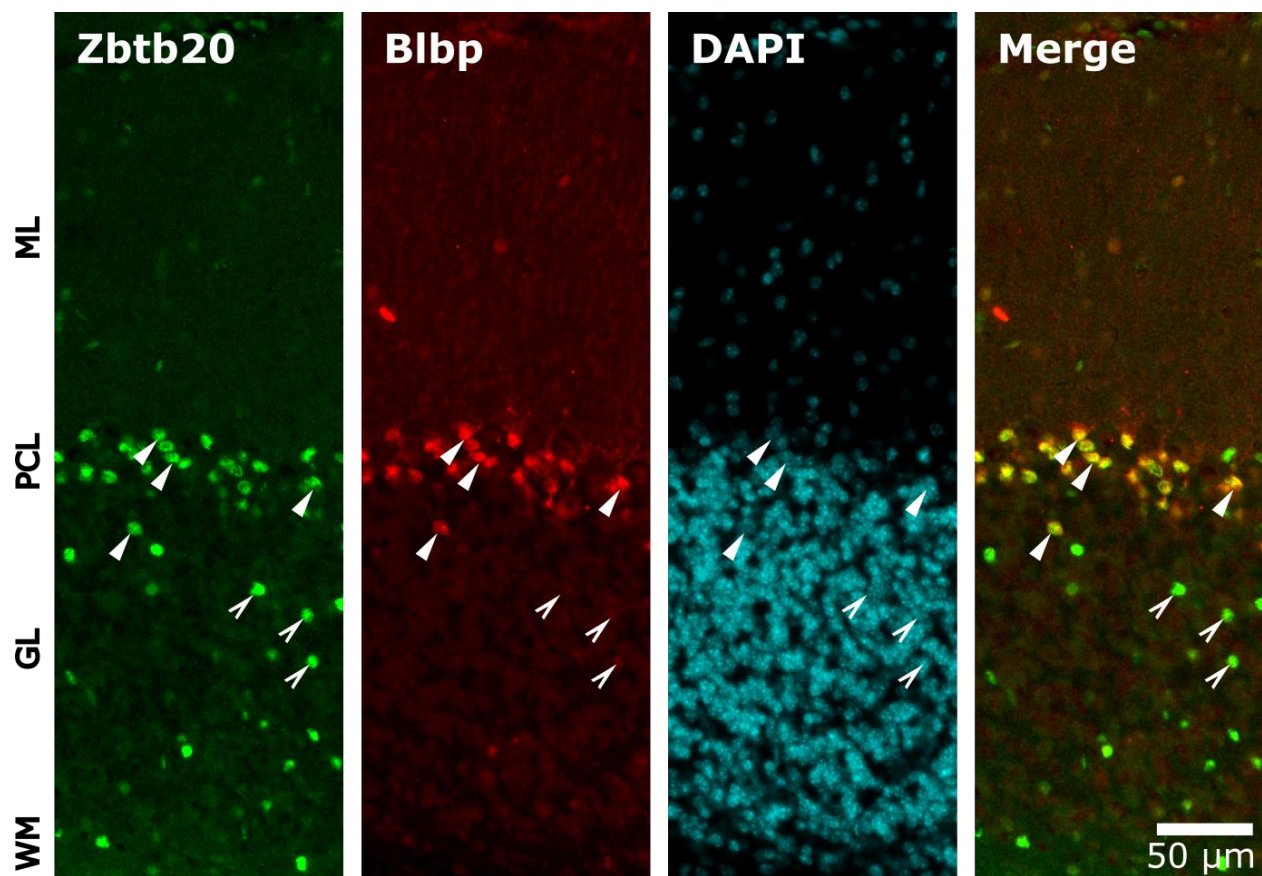
Фиг. 6 - $Zbtb20^+$ (в зелено, плътни стрелки) и $Parvalbumin^+$ клетки (в лилаво, отворени стрелки), на P30. Наслагването на двата образа (Merge) доказва липса на ко-локализация. Увел. x5. Снимката е представена със съгласието д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване на колокализацията на $Zbtb20^+$ и $Olig2^+$ клетки изследвахме малък мозък при зрели индивиди от див тип на P30. Приложихме оцветяване и с DAPI. На тази възраст установихме олигодендроцити ($Olig2^+$) клетки, експресиращи $Zbtb20$ само в бялото мозъчно вещество (фиг. 7).



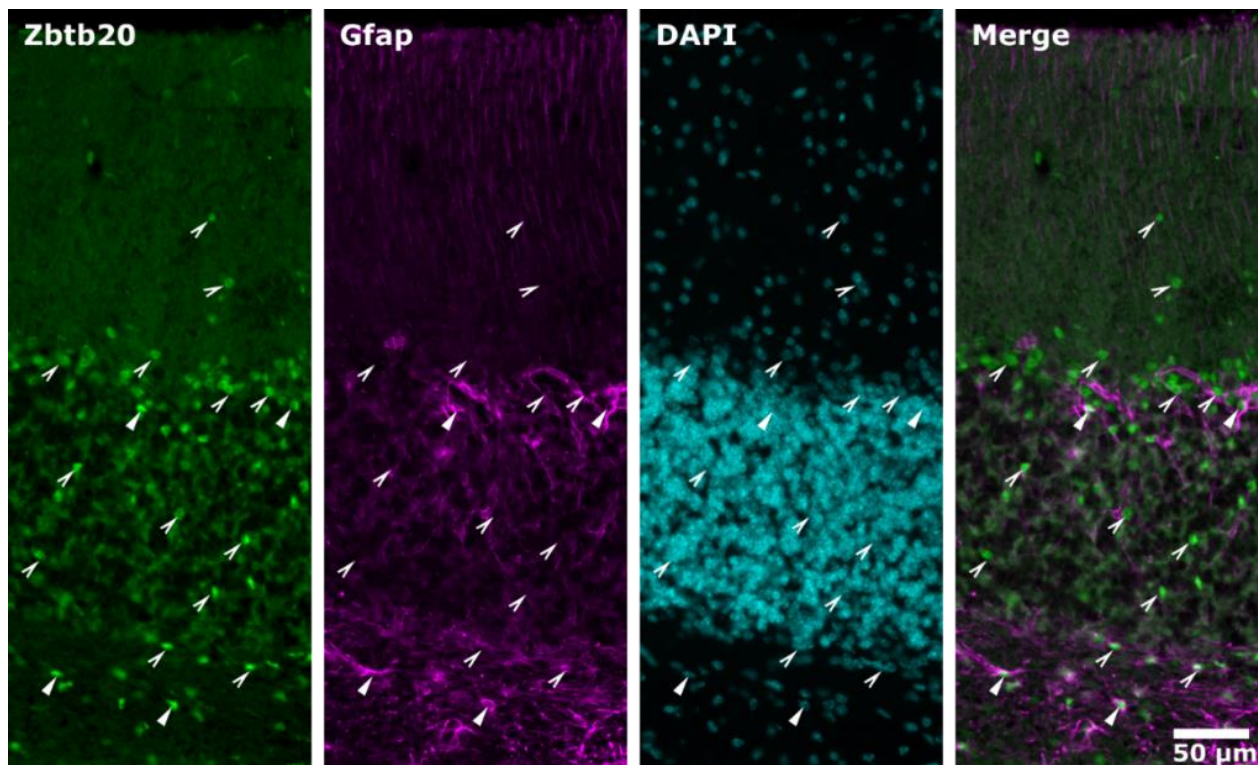
Фиг. 7 - $Zbtb20^{+}$ (в зелено, отворени стрелки) и $Olig2^{+}$ клетки (в лилаво, плътни стрелки) на P30. От наслагването на образите (Merge), става ясно, че ко-локализация се установява само в бялото вещество (WM). GL - Golgi слой; PCL - слой на клетките на Пуркиние; ML - молекулярен слой. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За установяване дали Бергмановата глия експресира $Zbtb20$ изследвахме малък мозък при зрели индивиди от див тип на P30. Приложихме оцветяване с маркера $Blbp$ и с DAPI. В слоя на Пуркиние се установяват двойнопозитивни клетки ($Blbp^{+}$ и $Zbtb20^{+}$) (фиг. 8).



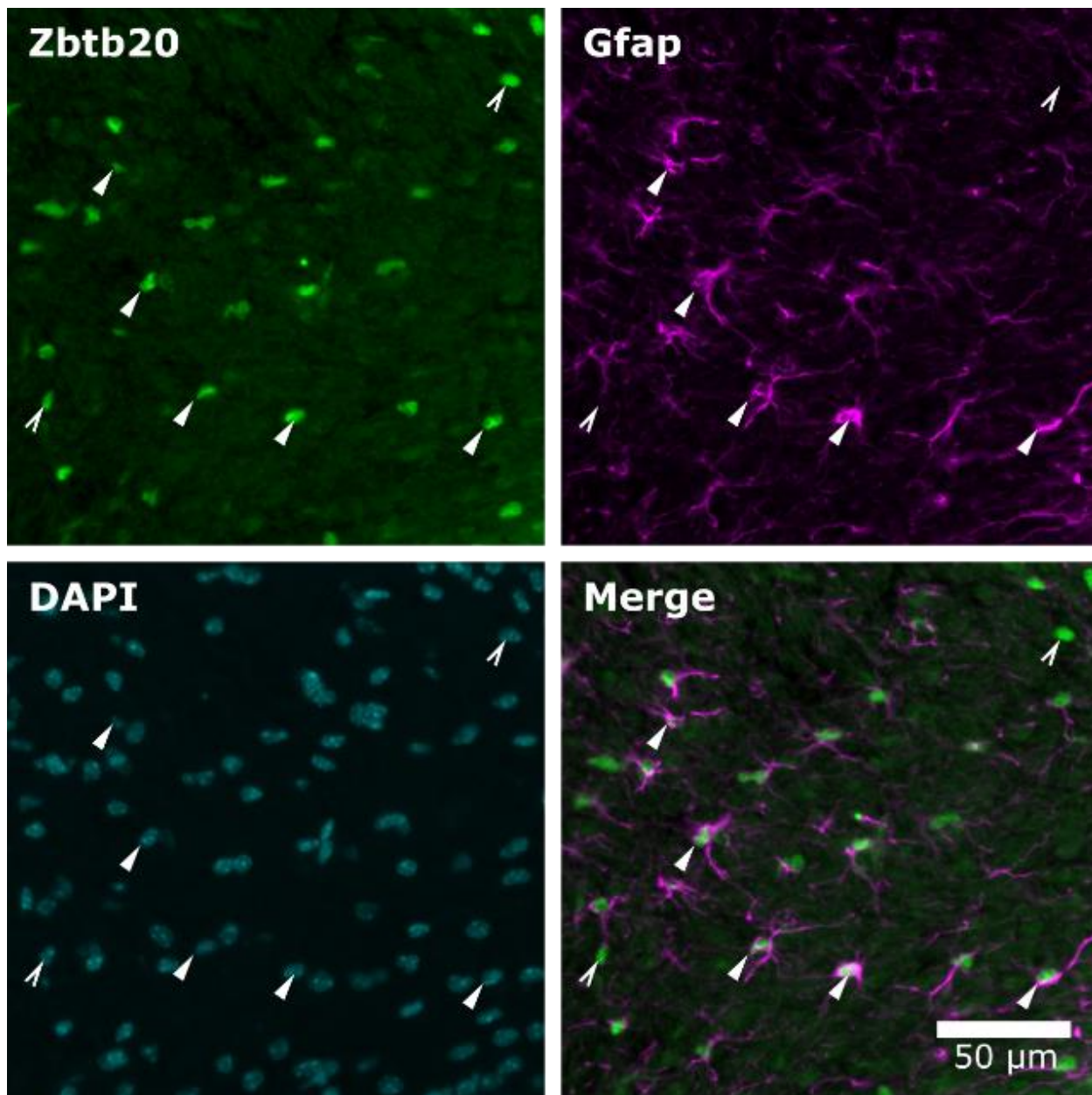
Фиг. 8 - Флуоресцентна микрофотография, показваща срези от малкомозъчна кора, позитивирани за Zbtb20 (в зелено, отворени стрелки) и Blbp (в червено, плътни стрелки) на P30. Наслагването на образите (Merge) показва, че колокализация има само в слоя на клетките на Пуркиние (в жълто-оранжево). Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За да установим дали протоплазмените астроцити в сивото вещество експресират Zbtb20 приложихме оцветяване с невроглиалния маркер GFAP на P30. Установихме малко количество двойнопозитивни протоплазмени астроцити, които да са положителни и за маркера Zbtb20 (фиг. 9).



Фиг. 9 - Флуоресцентна микроскопия, демонстрираща наличие на GFAP- (в лилаво, плътни стрелки) и Zbtb20-имунореактивност (клетки в зелено, посочени с отворени стрелки) в сивото вещество на малък мозък. Макар и в малко количество, наблюдават се двойно маркирани невроглиялни клетки – $GFAP^{+}/Zbtb20^{+}$ (оцветени почти в бяло и отбелязани на слетия образ с плътни стрелки). Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За да установим дали фиброзните астроцити в бялото вещество експресират Zbtb20 проведохме също изследване с маркера GFAP на възраст P30. Установихме двойнопозитивни клетки в бялото вещество ($GFAP^{+}$ и $Zbtb20^{+}$) (фиг. 10).

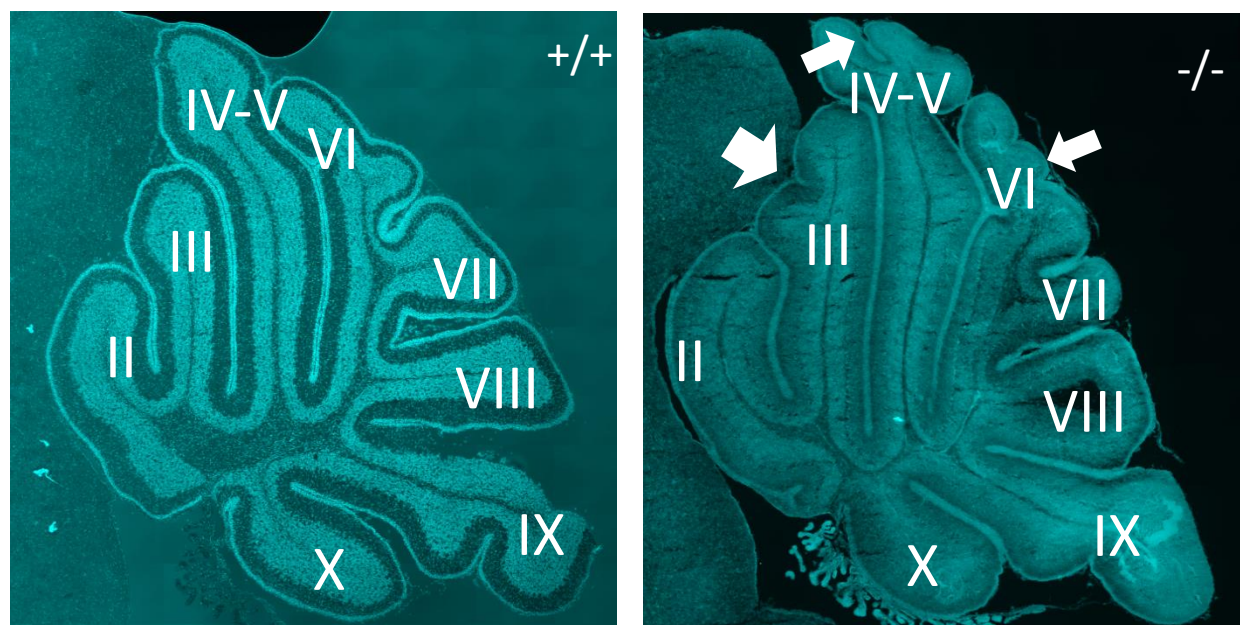


Фиг. 10 - Тъмнополева фотография на бяло вещество в миши малък мозък, демонстрираща наличие на цитоскелетния протеин GFAP в телата и израстъците на фиброзните астроцити (оцветени в лилаво и посочени с плътни стрелки). В зелено са оцветени клетките позитивни за Zbtb20. Наслагването на двата образа ясно показва наличие на Zbtb20 в ядрата на някои от фиброзните астроцити. Снимката е представена със съгласието на д-р Димо Стоянов и д-р Лора Велева.

За да проследим количествените и качествени различия при развитието на малък мозък при мишки (див тип и мутанти) проведохме имунофлуоресцентно изследване с маркера

DAPI (диаминофенилиндол). Наш интерес представляваха: развитието на малкомозъчните листа (фолия); дебелината на външния зърнест слой на различните възрастови периоди (P4, P8 и P12); площта на външен и вътрешен зърнест слой, както и на молекулярния слой на различните възрастови периоди (P4, P8 и P12).

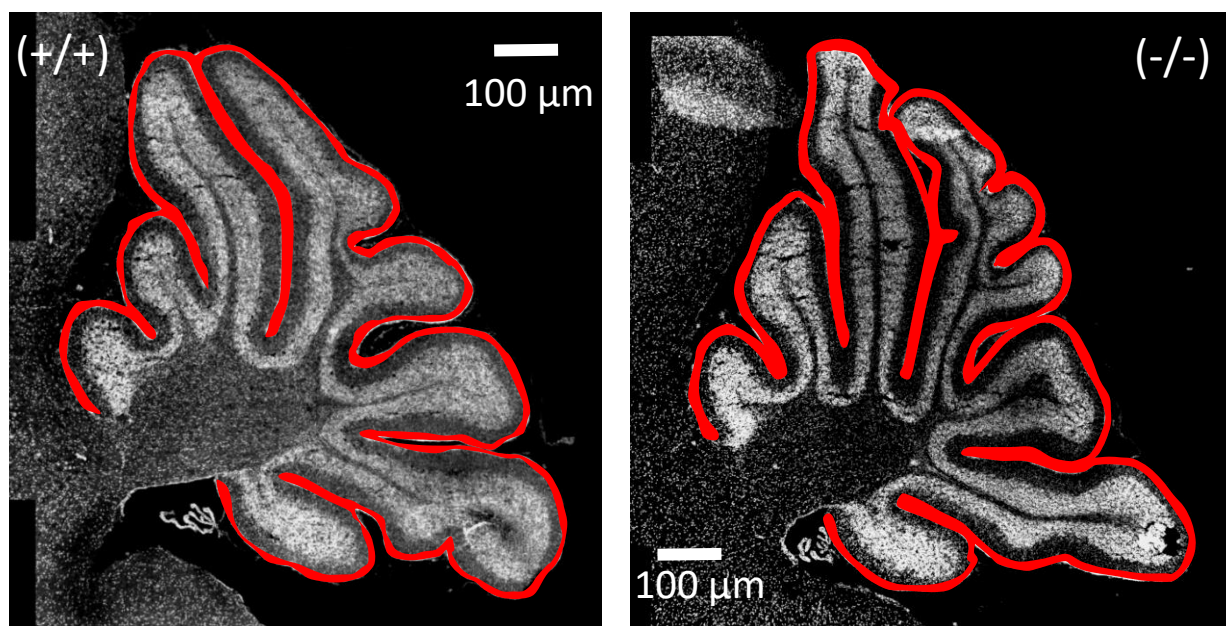
При изследване на развитието на малкомозъчните листа (фолия) на различните възрастови периоди установяваме следните резултати: На P4 се установи сходен брой фолия при мишки от див тип и при мутанти. В областта на девето малкомозъчно фолио при мишки от див тип се установява допълнителна цепка и подфолио. На етап P8 се установи сходен брой фолия при мишки от див тип и при мутанти. При мутанти в областта на трето фолио, както и при четвърто и пето фолио установяваме допълнителна цепка, както и допълнително подфолио. На P12 се установява сходен брой фолия при мишки от див тип и при мутанти (фиг. 11).



Фиг. 11 - Установяваме десет фолия при мишки от див тип и при мутанти. Допълнително подфолио установяваме при мутанти при трето, четвърто, пето и шесто фолия. Увел. x5 (Фиг. 11 е представена със съгласието на Д-р Димо Стоянов д.м.).

Проведохме измерване на общата площ на срез на различните възрастови периоди при контроли и мутанти. На P4 не се установява разлика в общата площ при мишки от див тип, в сравнение с мутанти. При провеждане теста на Стюдънт не се установява статистически

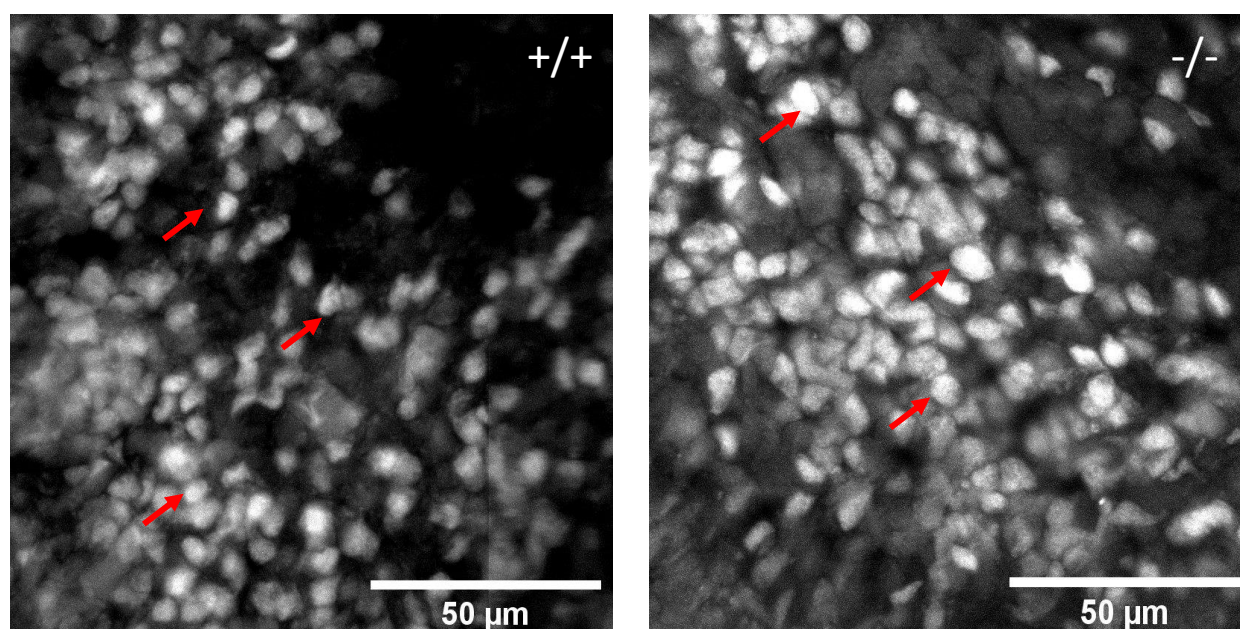
достоверна разлика ($p=0,1$). Измерената площ при индивидите от див тип беше 2,8 кв.мм., а при мутантите – 2,7 кв.мм. На P8 не се установява разлика в общата площ при мишки от див тип, в сравнение с мутанти ($p=0,12$). Измерената площ при индивидите от див тип беше 4,1 кв.мм., а при мутантите – 3,9 кв.мм. На P12 също не установихме разлика в общата площ при мишки от див тип, в сравнение с мутанти ($p=0,12$). Измерената площ при индивидите от див тип беше 5,9 кв.мм., а при мутантите – 5,7 кв.мм. Изследвахме и площта на слоевете в малкомозъчната кора на P12. Не установихме статистически достоверна разлика в площта на външния зърнест слой между индивидите от див тип и мутанти ($p=0,189$). При индивидите от див тип тази площ е 0,485 кв.мм., а при мутантите – 0,507 кв.мм.



Фиг. 12 – Външен зърнест слой на P12 (див тип вляво и мутант вдясно).

Изследвахме и площта на молекулярния слой на P12. При индивидите от див тип тази площ е 1,373 кв.мм., а при мутантите е 1,425 кв.мм. При провеждане теста на Стюдънт ($p=0,12$). При изследване площта на слоя на клетките на Пуркиние на възраст P12 не установяваме разлика между индивидите от див тип и хомозиготните мутанти ($p=0,2$). При индивидите от див тип тази площ е 0,588 кв.мм., а при мутантите е 0,611 кв.мм. Изследвахме площта на вътрешния зърнест слой на P12. Установяваме сходна площ на този слой при

мишки от див тип и при мутанти ($p=0,28$). При индивидите от див тип тази площ е 2,086 кв.мм., а при мутантите е 2,198 кв.мм. Проведохме имунофлуоресцентно изследване с невроналния маркер NeuN, за да определим количеството и разпределението на невроните в малкия мозък. Обект на нашето внимание представляваха невроните от вътрешния зърнест слой. Измерванията проведохме по малкомозъчни листа в области на изследване с площ от 10000 μm^2 . На P4 не установихме статистически значима разлика в броя NeuN – имунопозитивни клетки между индивидите от див тип и хомозиготните мутанти. Това наблюдавахме както в отделните малкомозъчни листа, така и средноаритметично за целия срез ($p=0,447$). При индивидите от див тип и при мутанти най – голям брой клетки се установи при осмо малкомозъчно фолио. Най – малък брой клетки при индивидите от див тип и мутанти се установи при трето малкомозъчно листо.

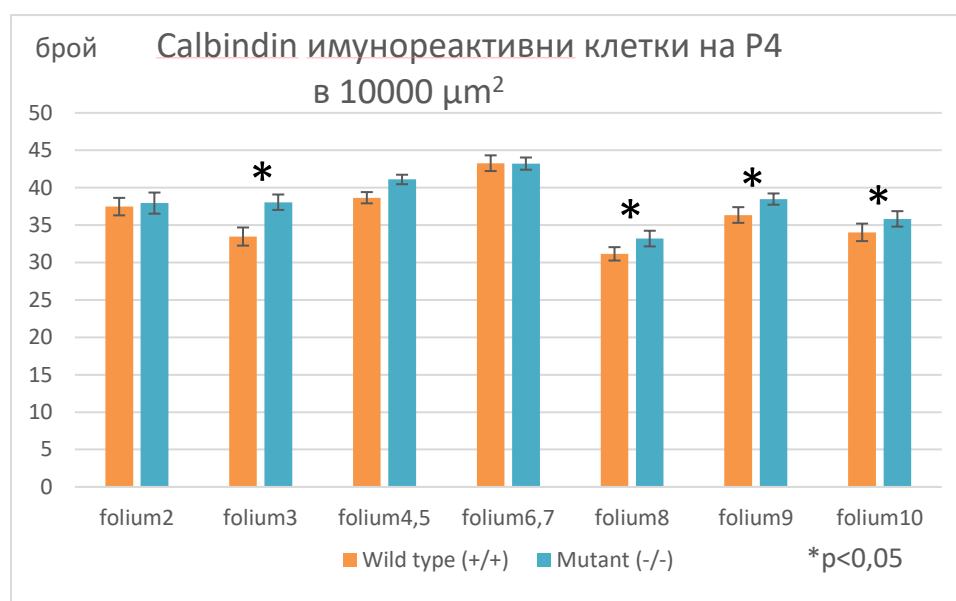


Фиг. 13 – Флуоресцентни образи на срези от малък мозък на контролни животни (+/+) и хомозиготни мутанти (-/-) на възраст P4, илюстриращи NeuN-имунопозитивни клетки.

На морфологична възраст P8 не установяваме статистически достоверна разлика в броя неврони във вътрешния зърнест слой при мишки от див тип и при мутанти. Средноаритметично за всички фолия $p=0,69$. При индивидите от див тип установихме най-голям брой клетки при шесто фолио, а при мутанти – при седмо. На P12 установяваме сходен

брой NeuN имунореактивни клетки във вътрешния зърнест слой при мишки от див тип и при хомозиготни мутанти. Средноаритметично за всички малкомозъчни листа $p=0,633$. Най-голям брой клетки при мишките от див тип и при мутанти установихме при шесто фолио.

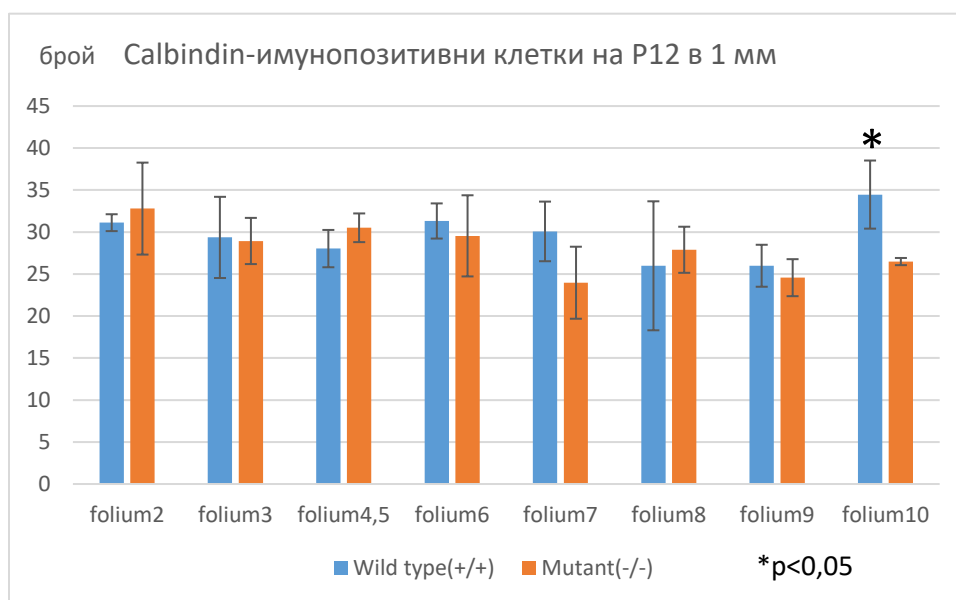
Проведохме изследване и с маркера Calbindin, за да установим количеството и разпределението по фолия на клетките на Пуркиние. На възраст P4 изследвахме броя на клетките на Пуркиние по фолия в зони на интерес с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Установихме по-голям брой клетки при мутанти, в сравнение с мишки от див тип. Статистически достоверна разлика установихме при трето, осмо, девето и десето фолио ($p<0,05$). При останалите малкомозъчни листа $p>0,05$ (фиг. 14).



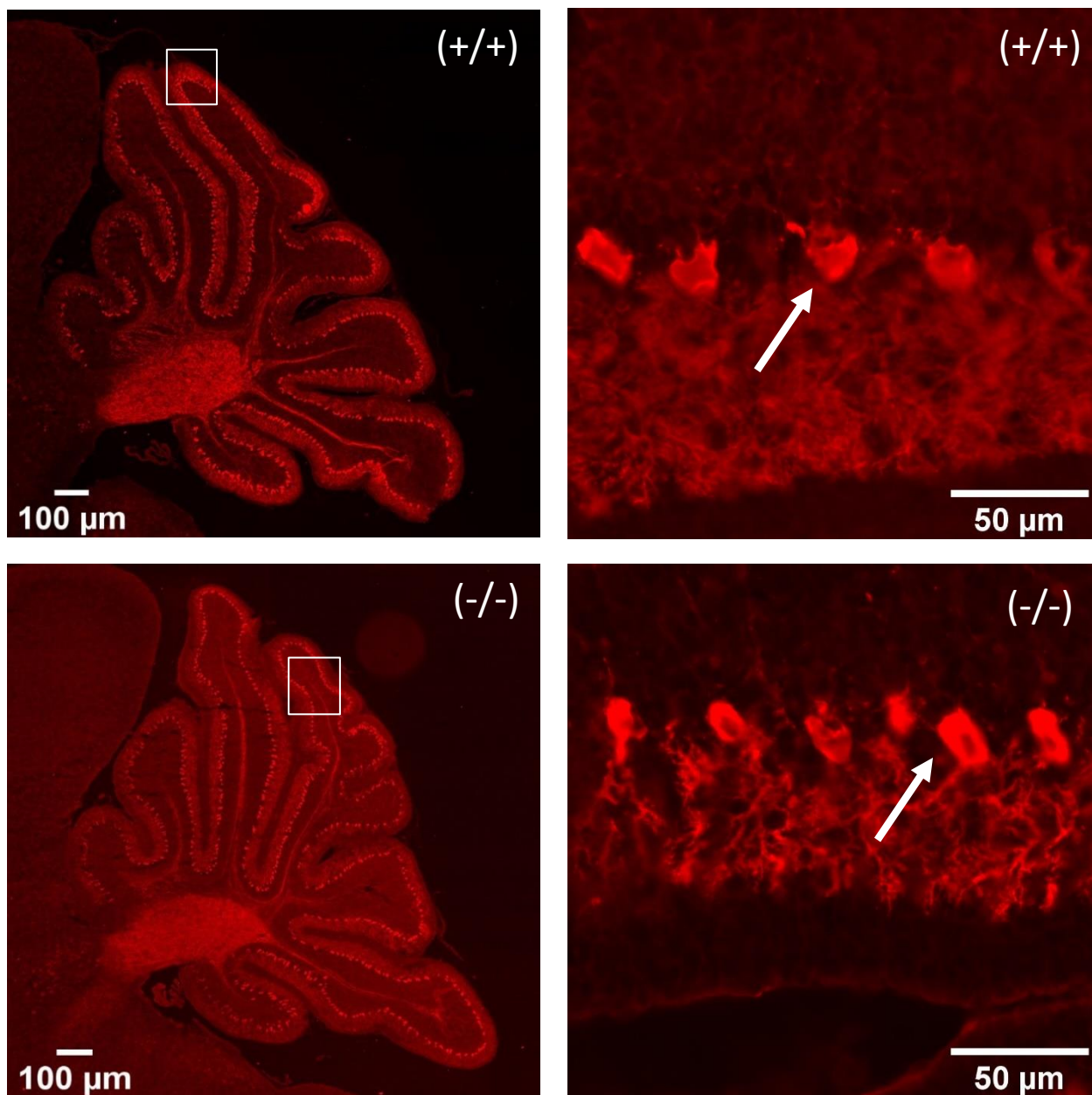
Фиг. 14 - Количествен анализ на броя СВ-имунореактивни клетки на Пуркиние при мишки от див тип и при мутанти на P4. При фолия 3, 4-5 и 6-7 бе наблюдаван лек превес на този брой при мутантите, докато във фолия 3, 8, 9 и 10 разликата беше статистически значима в полза на мутантите.

Изследвахме Calbindin – имунореактивните клетки на P4 и в 1 мм. дължина като си подбирахме области на изследване на случаен принцип, без да правим спецификация по малкомозъчни фолия. Установихме по-висок брой клетки при мутантни животни, в сравнение с мишки от див тип. Разликата има статистическа значимост ($p=0,004$). На осми постнатален ден (P8) изследвахме броя клетки на Пуркиние по фолия в области с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Установихме лек превес на броя клетки при мутантни животни. Статистически

достоверна разлика установихме при трето и десето фолия. При тези фолия $p < 0,05$. При останалите малкомозъчни листа не установихме статистически значима разлика. Също така на P8 изследвахме броя клетки на Пуркиние в случайно избрани области с дължина от 1 мм. по протежение на целия срез. Не установихме разлика в броя клетки при мутантни животни, в сравнение с мишки от див тип (контроли) ($p = 0,07$). На дванадесети следродилден ден (P12) изследвахме броя клетки на Пуркиние по фолия в области с дължина от 1 мм.. Установихме лек превес на броя клетки при мутантни животни, в сравнение с мишки от див тип (контроли). Статистически достоверна разлика установихме единствено при десето фолио – $p = 0,02$ (фиг. 15).



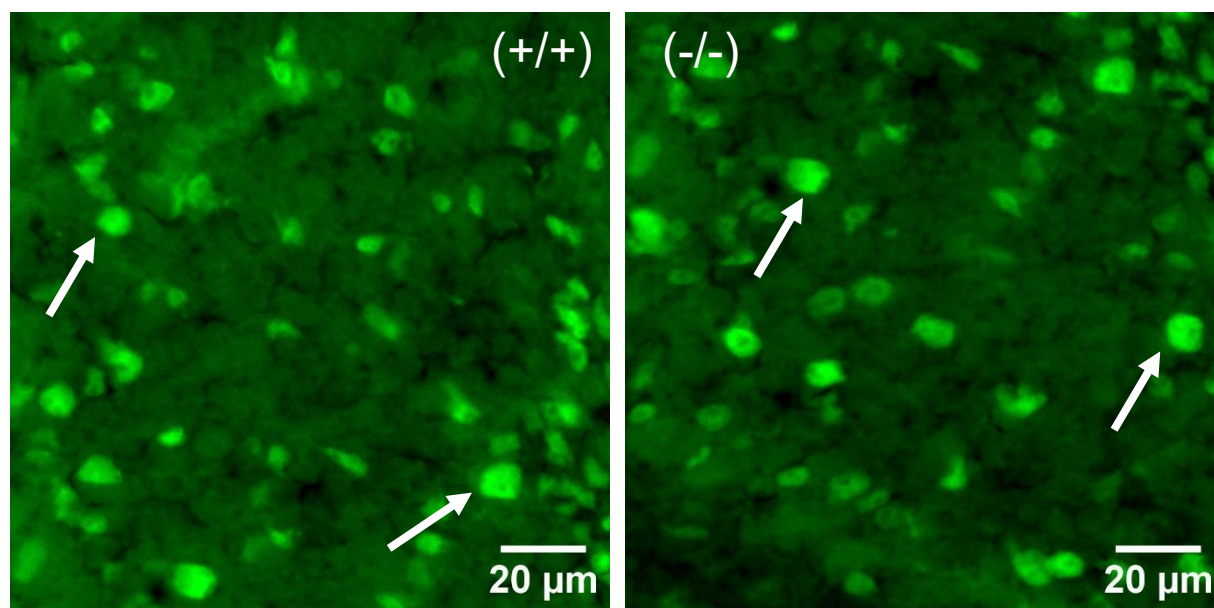
Фиг. 15 - Графика, сравняваща броя на клетките на Пуркиние при двата типа експериментални животни на P12, по протежение на 1 мм. Броят на СВ-имунореактивните клетки при мишки от див тип бе незначително по-голям в сравнение с мутантите при фолия 1-9. Единствено статистически значима разлика се вижда при десето фолио, където в контролите бяха отчетени 35 клетки/мм, а при мутантите 26 клетки/мм ($p = 0.02$).



Фиг. 16 – Клетки на Пуркиние, маркирани с СВ на възраст P12. Снимките горе са на срези от церебелум на мишки див тип (+/+), а тези долу са от мутанти (-/-). Рамкираните участъци от образите на малко увеличение (x5) вляво са показани в близък план на увеличение x40 (вдясно). Със стрелка са посочени отделни клетки на Пуркиние.

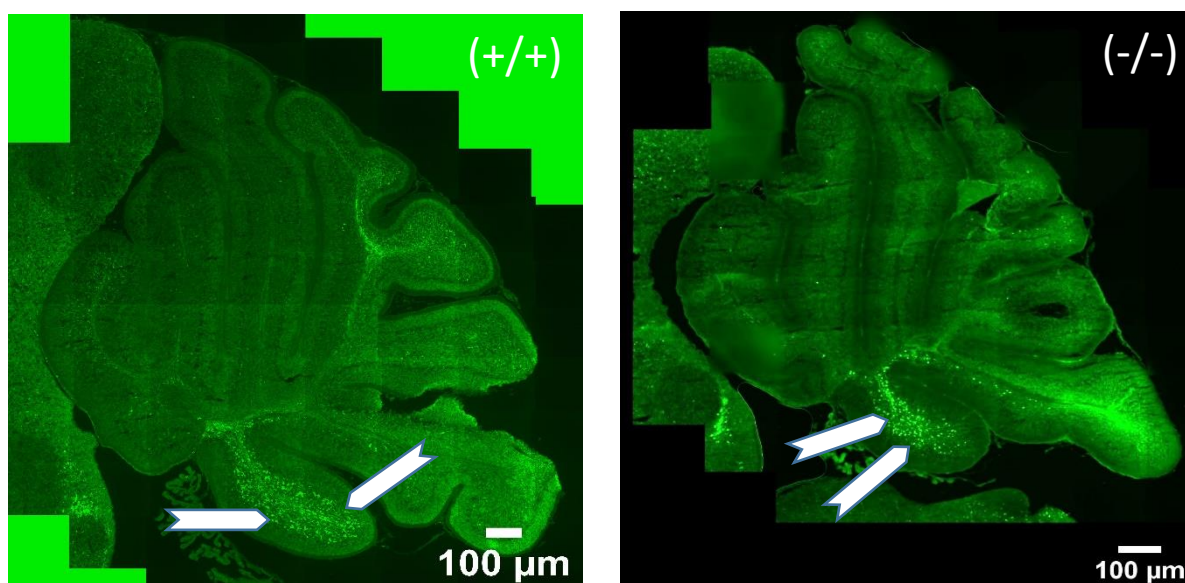
За да установим количеството и разпределението по фолия на униполярните четковидни клетки проведохме имунохистохимично изследване с маркера Calretinin. На възраст P4 установихме сходен брой униполярни четковидни клетки на цял срез при мишки от див тип и при мутанти. При провеждане на Т-тест $p = 0,45$. Установяваме, че Calretinin

предилекционно се експресира в последните малкомозъчни листа (девето и основно в десето). Анализирахме статистически и броя клетки в последното малкомозъчно фолио на възраст P4 в области на изследване с площ от $10000\ \mu\text{m}^2$. Установихме сходен брой униполярни четковидни неврони при мишки от див тип и при Zbtb20 knockout мутанти. Разликата няма статистическа достоверност ($p=0,101$). При индивидите от див тип установихме 50 клетки, а при мутанти 52 клетки. На възраст P8 установихме сходен брой униполярни четковидни клетки на цял срез при мишки от див тип и при мутанти, с лек превес при мутанти. При провеждане на Т-тест $p=0,24$. Установяваме, че Calretinin предилекционно се експресира в последните малкомозъчни листа (девето и основно в десето). Анализирахме статистически и броя клетки в последното малкомозъчно фолио на възраст P8 в области на изследване с площ от $10000\ \mu\text{m}^2$. Установихме сходен брой униполярни четковидни неврони при мишки от див тип и при Zbtb20 knockout мутанти. Разликата няма статистическа достоверност ($p=0,08$). При индивидите от див тип установихме 70 клетки, а при мутанти 71 клетки.

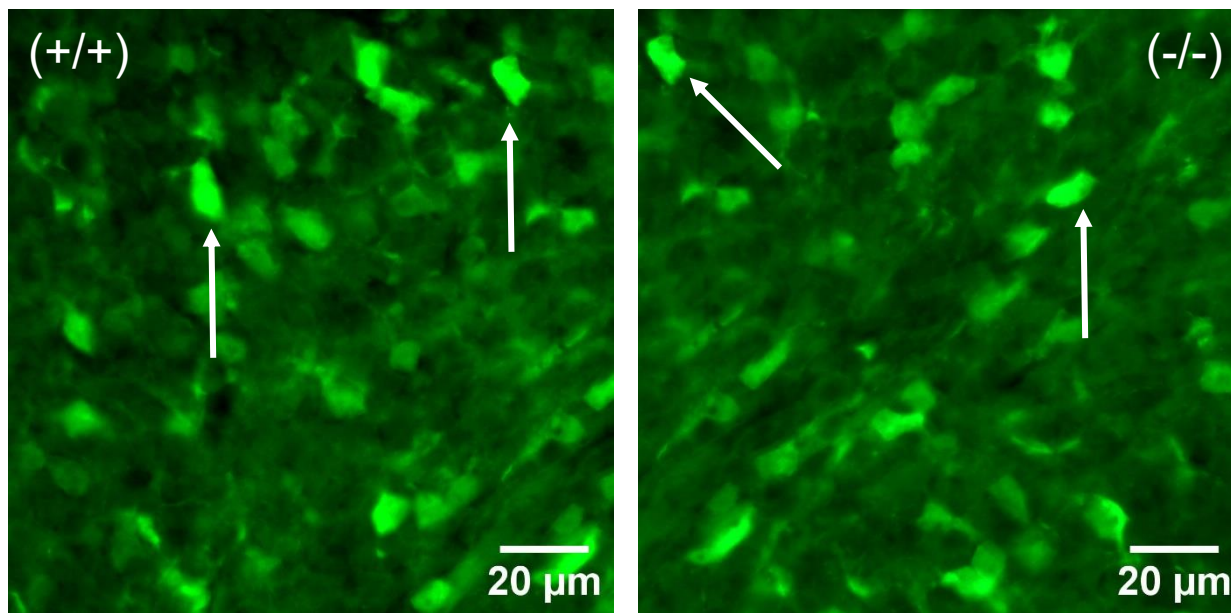


Фиг. 17 - Calretinin - имунореактивни клетки при мишки от див тип (вляво) и при мутанти (вдясно), от областта на десето малкомозъчно фолио на морфологична възраст P8. Увел. $\times 20$.

На възраст P12 установихме сходен брой униполярни четковидни клетки на цял срез при мишки от див тип и при мутанти. При провеждане на Т-тест $p = 0,23$ (фиг. 48). Установяваме, че Calretinin предилекционно се експресира в последните малкомозъчни листа (девето и основно в десето). Анализирахме статистически и броя клетки в последното малкомозъчно фолио на възраст P12 в области на изследване с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Установихме сходен брой униполярни четковидни неврони при мишки от див тип и при Zbtb20 knockout мутанти. Разликата няма статистическа достоверност ($p = 0,06$). При индивидите от див тип установяваме 68 клетки, а при хомозиготните мутанти 73 клетки.

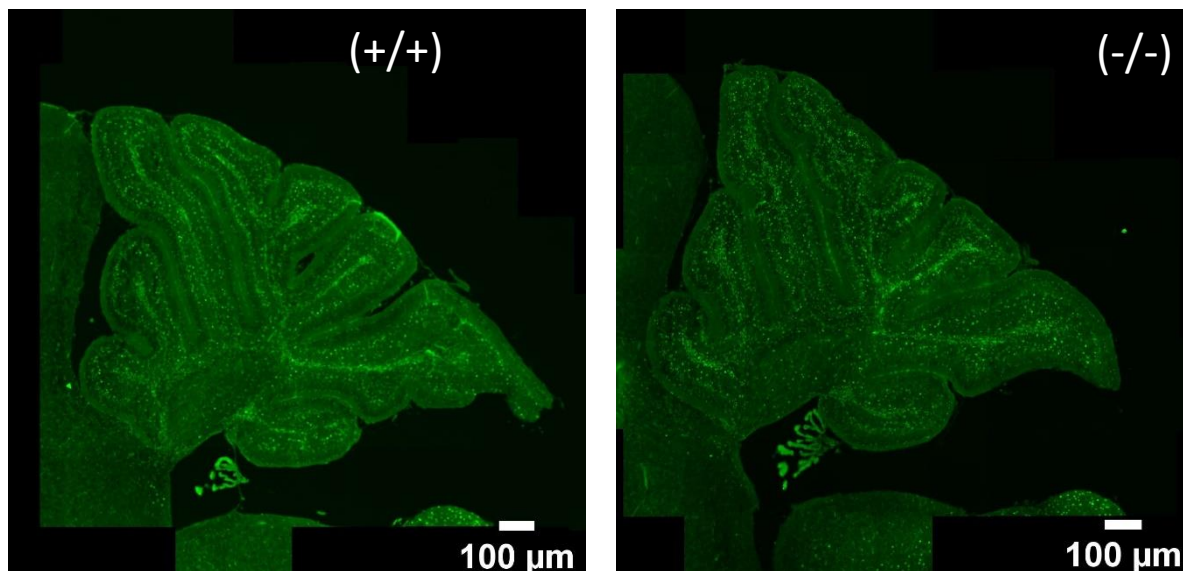


Фиг. 18 - Обзорни фотографии на идентични срези от малък мозък на мишки от див тип (+/+) и мутанти (-/-) на P12, илюстриращи разположението на CR^+ четковидни клетки (стрелки) предимно в десето малкомозъчно фолио. Увел. $\times 5$.

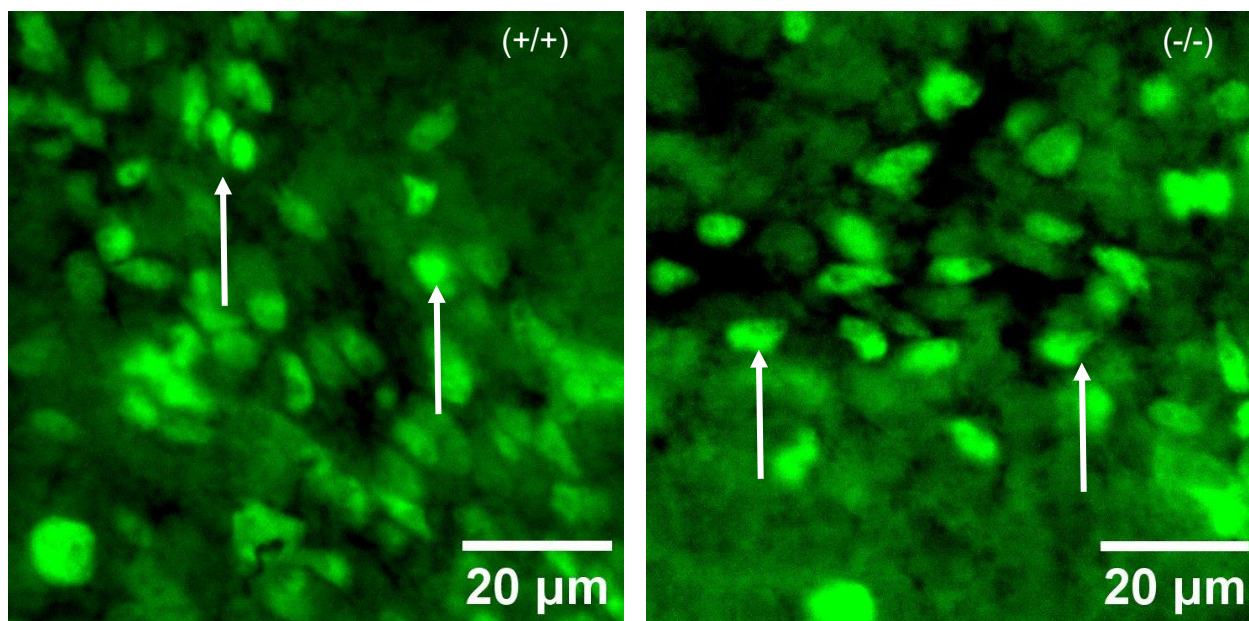


Фиг. 19 - Близък план на CR-имунореактивни клетки (стрелки) при мишки от див тип (+/+) и при мутанти (-/-) в областта на десето малкомозъчно фолио на P12. Увел. x20.

За да установим количеството и разпределението по фолия на клетките на Голджи тип II в малкомозъчната кора проведохме имунофлуоресцентно оцветяване с маркера Рах2. На възраст P4 изследвахме разпределението по малкомозъчни фолия на клетките на Голджи тип 2 в области на изследване с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Не открихме разлика в броя клетки при мишки от див тип, сравнено с мутанти ($p=0,29$). На възраст P8 изследвахме броя на клетките на Голджи тип II в области на изследване с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Не открихме разлика в броя клетки при мишки от див тип, сравнено с мутанти ($p=0,5$).



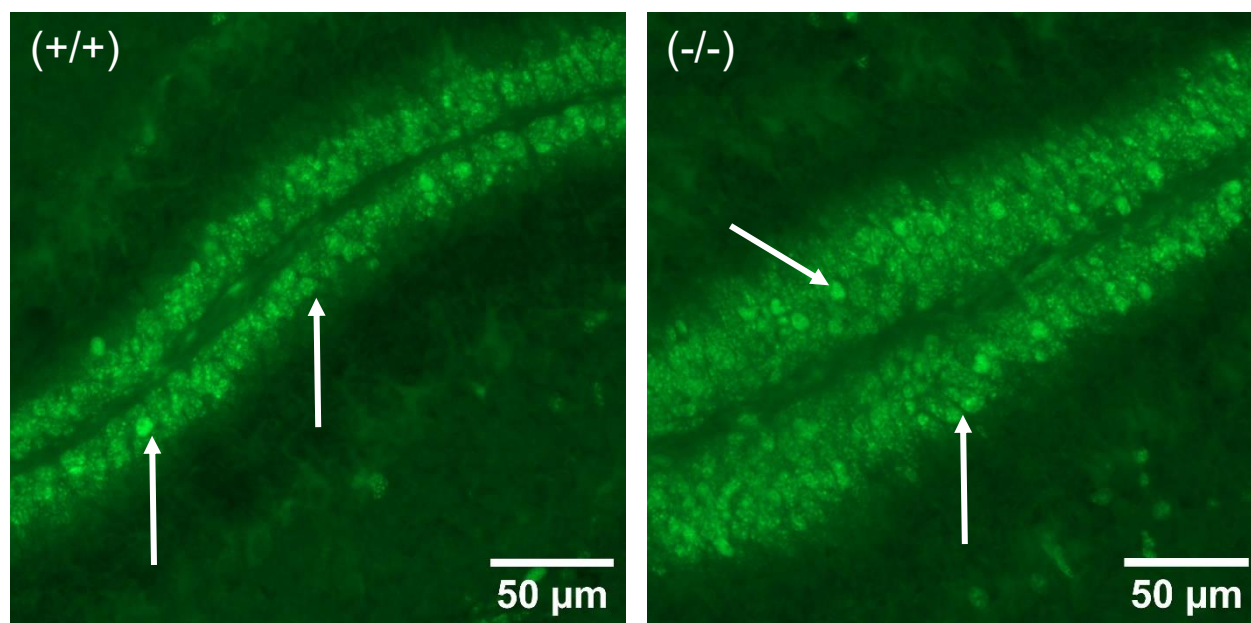
Фиг. 20 – Обзорни флуоресцентни микрофотографии на аналогични срези от церебелум на мишка от див тип (+/+) и мутант (-/-), илюстриращи разпределението на Pax2-имунореактивните клетки на възраст P8. Увел. x5.



Фиг. 21 – Pax2-имунореактивни клетки (стрелки) от областта на четвърто малкомозъчно фолио. Мишка от див тип (+/+) и мутант (-/-) на възраст P8. Увел. x20.

На морфологична възраст P12 анализирахме броя на клетките на Голджи тип 2 в области на изследване с площ от $10000\ \mu\text{m}^2$. Не установихме статистически достоверна разлика в броя клетки между мишки от див тип и мутанти ($p=0,4$).

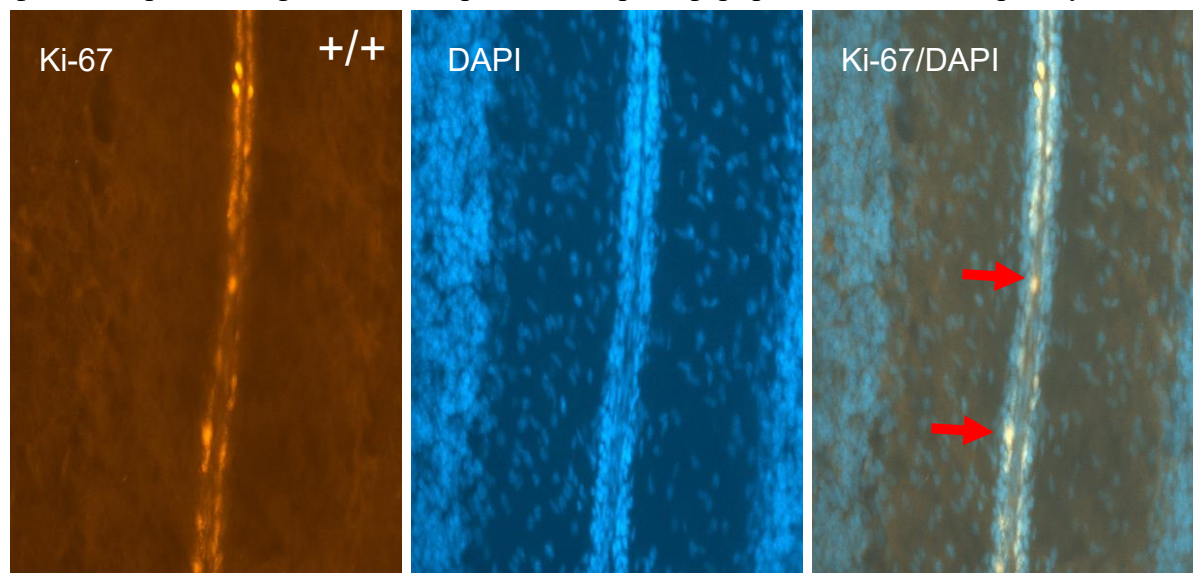
За да определим количеството и разпределението на пролифериращите клетки в малкия мозък проведохме имунофлуоресцентно оцветяване с маркера Ki-67. Проведохме изследване за количеството и разпределението на Ki-67 имунореактивните клетки в сходни области с площ $10000\ \mu\text{m}^2$ при мишки от див тип и при мутанти. Проведохме изследването по протежение на целите малкомозъчни листа, в пределите на молекулярния и на външния зърнест слой, на трите възрастови периода. На възраст P4 установихме сходен брой пролифериращи клетки при индивиди от див тип и при мутанти ($p=0,53$). На възраст P8 установихме сходен брой пролифериращи клетки при индивиди от див тип и при мутанти ($p=0,34$).



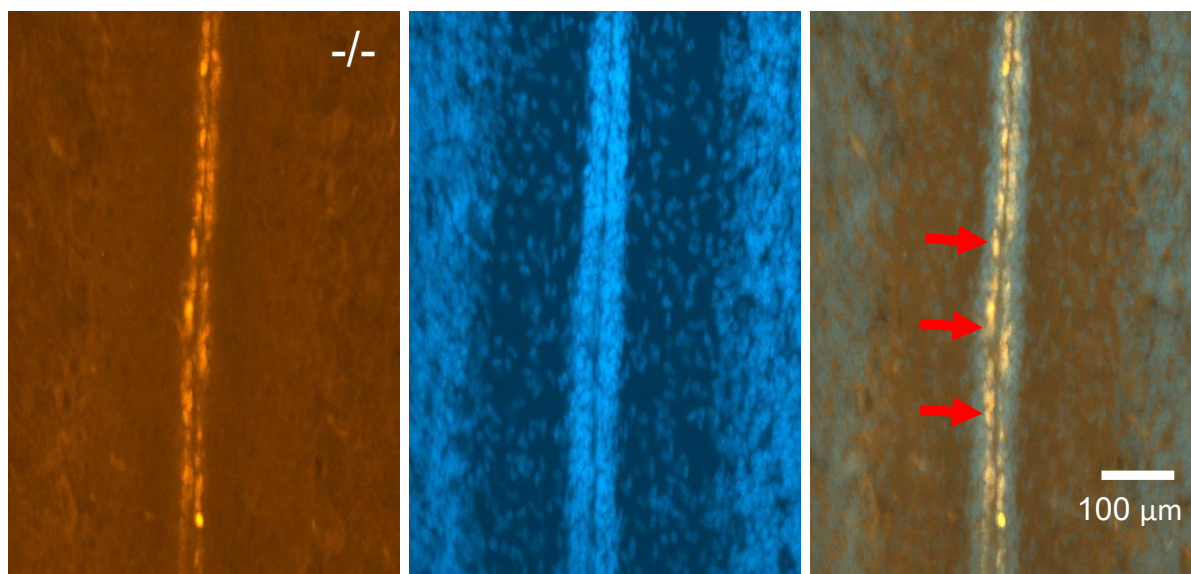
Фиг. 22 - Тъмнополеви микрофотографии в близък план на участъци от кората, илюстриращи наличието на Ki-67-имунопозитивни клетки (стрелки) при мишка див тип (+/+) и мутант (-/-) на P8. Увел. x20.

На възраст P12 установихме сходен брой пролифериращи клетки при индивиди от див тип и при мутанти ($p=0,52$). И на трите възрастови периода се установи лек превес в броя клетки при мишки от див тип, но разликата няма статистическа значимост.

За да определим количеството и разпределението на пролифериращите клетки в малкия мозък проведохме имунофлуоресцентно оцветяване с маркера Ki-67 и на морфологична възраст P12. Фокусирахме се върху количеството и разпределението на Ki-67 имунореактивните клетки в сходни области с площ $10000 \mu\text{m}^2$ при мишки от див тип и при мутанти. Зоните са по протежение на целите малкомозъчни листа, в пределите на молекулярния и на външния зърнест слой на възраст P12. В същите участъци изследвахме и DAPI – имунопозитивните клетки. Изчислихме процентното съотношение между Ki-67 имунореактивните клетки и DAPI – имунопозитивните клетки. Статистически достоверна разлика установихме при второ, четвърто, пето, шесто, девето и десето малкомозъчно фолио. При тези фолия има превес на пролифериращите клетки при мутанти и при

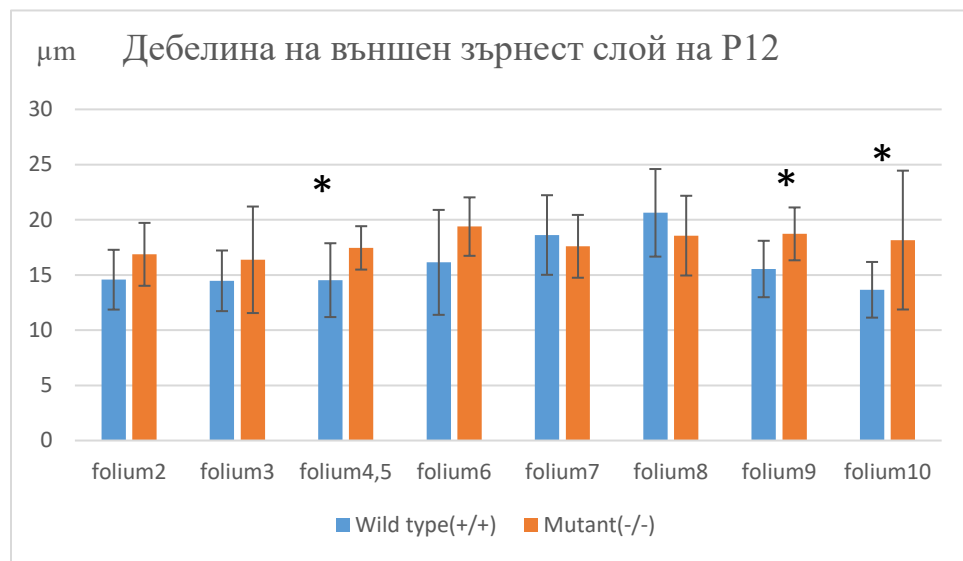


провеждане на теста на Стюдънт $p<0,05$. При останалите фолия не установяваме статистически достоверна разлика.

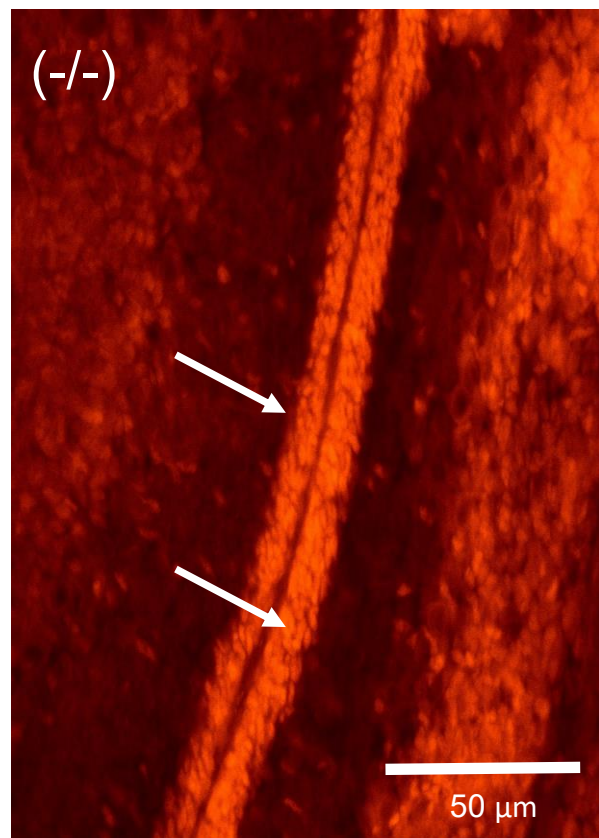
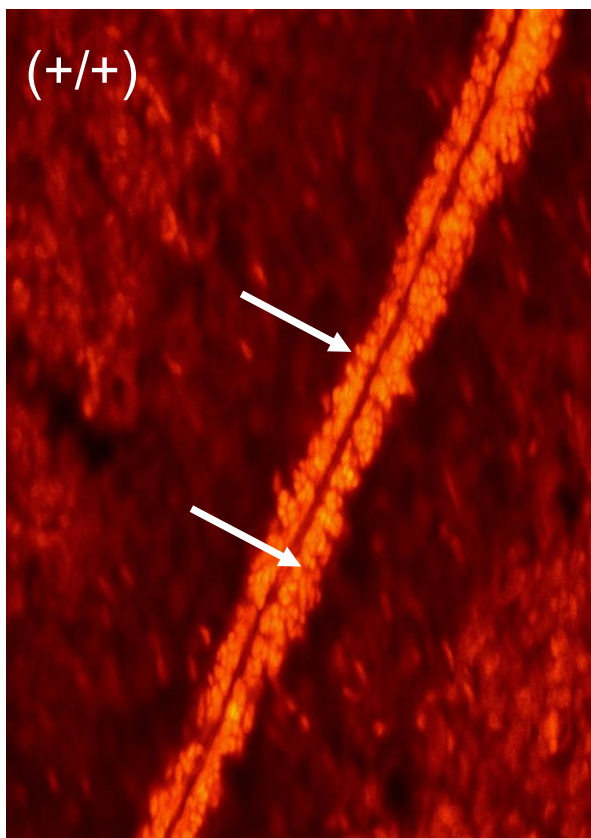


Фиг. 23 – Проллифериращи клетки (стрелки) от областта на четвърто и пето малкомозъчно фолио при мишка от див тип (+/+) и мутант (-/-), в по-голямо количество при мутантите. Увел. $\times 40$.

За да определим количеството и разпределението на зърнестите неврони във външния зърнест слой проведохме изследване с маркера Pax6. Анализът проведохме във всички малкомозъчни фолия в сходни области с площ от $10000 \mu\text{m}^2$ при мишки от див тип и при мутанти на възраст P12. Статистически достоверна разлика установяваме при шесто и десето малкомозъчно фолио ($p < 0,05$). При тях по-голям брой зърнести неврони се установяват при индивидите от див тип, сравнено с мутанти. Изследвахме средния брой Pax6 имунопозитивни клетки във всички малкомозъчни фолия в области на изследване от $10000 \mu\text{m}^2$. Не установяваме статистически достоверна разлика между индивидите от див тип и мутанти ($p = 0,24$). Изследвахме и дебелината на външния зърнест слой по фолия при индивиди от див тип и при мутанти също използвайки маркера Pax6. Статистически достоверна разлика откриваме при четвърто, пето, осмо, девето и десето малкомозъчно фолио. При тези фолия $p < 0,05$. При останалите малкомозъчни листа не установихме статистически достоверна разлика (фиг. 24).



Фиг. 24 – Графика, отразяваща дебелината на външния зърнест слой по фолиа на P12. Със * са обозначени данните, чиито разлики са статистически значими.



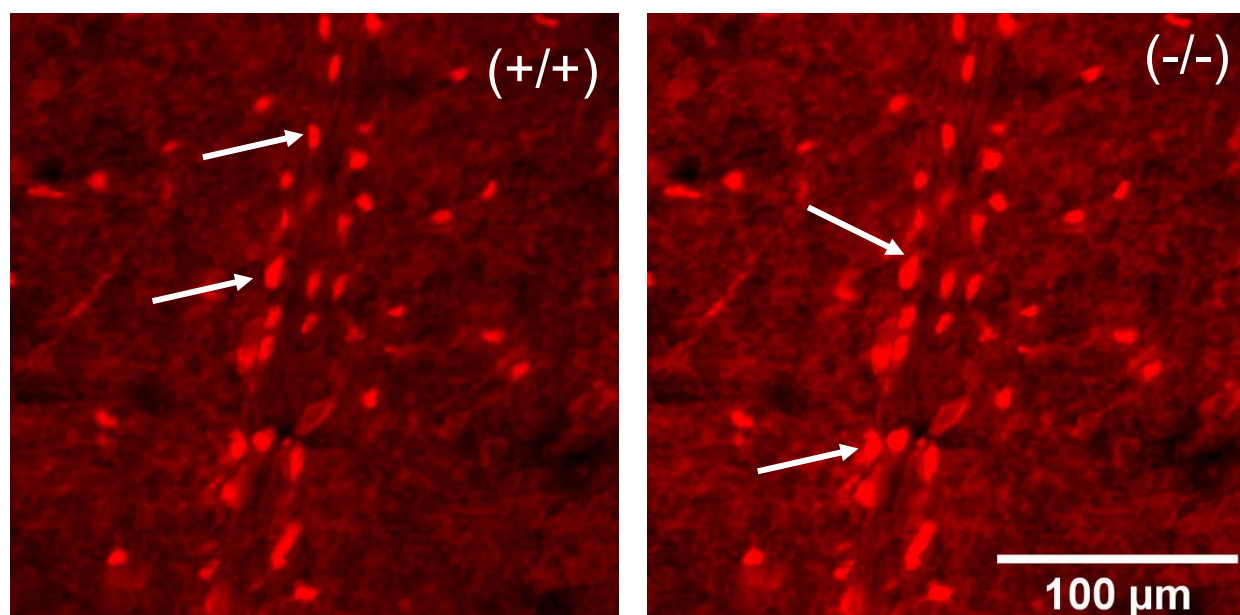
Фиг. 25 – Външен зърнест слой в областта на четвърто и пето фолио при мишка от див тип вляво и мутант вдясно. Установяваме по – голяма дебелина на този слой при мутантни животни. Увел. x 40.

Изследвахме средната дебелина на външния зърнест слой, анализирайки всички малкомозъчни листа заедно и пресметнахме средноаритметичната стойност за целия срез. Не установяваме статистически значима разлика в дебелината на външния зърнест слой на възраст P12 между индивидите от див тип и хомозиготни мутанти ($p=0,1$).

За да направим количествен анализ на астроцитите в малкия мозък проведохме имунофлуоресцентно изследване с маркера GFAP. Измерихме GFAP – имунопозитивната площ на цял срез. Съпоставихме тази зона с общата площ на среза от малък мозък. На възраст P4 не установихме разлика в площта между индивидите от див тип и мутантите ($p=0,11$). При съпоставяне на съотношението между GFAP – имунопозитивната площ и площта на целия срез между контроли и мутанти, установихме, че няма статистически достоверна разлика между индивидите от див тип и мутантите ($p=0,4$). При индивидите от див тип 8,53% от общата площ на среза е GFAP – имунопозитивна, а при мутантите – 8,32% от общата площ на среза е GFAP - имунопозитивна. На възраст P8 установихме сходна GFAP – имунопозитивна площ на целия срез при мишки от див тип и при мутанти ($p=0,1$). При индивидите от див тип е 0,38 кв.мм., а при мутантите – 0,396 кв.мм. При съпоставяне на съотношението между GFAP – имунопозитивната площ и площта на целия срез между контроли и мутанти на P8, установихме, че това съотношение е сходно ($p=0,07$). При индивидите от див тип 13,3% от общата площ на среза е GFAP – имунопозитивна, а при мутантите – 14,45% от общата площ на среза е GFAP - имунопозитивна. На възраст P12 не установихме разлика в GFAP – имунопозитивната площ на целия срез между мишки от див тип и мутанти ($p=0,4$). При индивидите от див тип е 0,788 кв.мм., а при мутантите – 0,884 кв.мм. Не установихме разлика в съотношението между GFAP – имунопозитивната площ и площта на целия срез между контроли и мутанти на възраст P12 ($p=0,1$). При индивидите от див тип 14,32% от общата площ на среза е GFAP – имунопозитивна, а при мутантите – 16,74% от общата площ на среза е GFAP - имунопозитивна.

За да определим количеството и разпределението на олигодендроцитите в малък мозък проведохме изследване с маркера Olig2. Изследването проведохме във всички малкомозъчни фолия в сходни области с площ от 10000 μm^2 при мишки от див тип и при

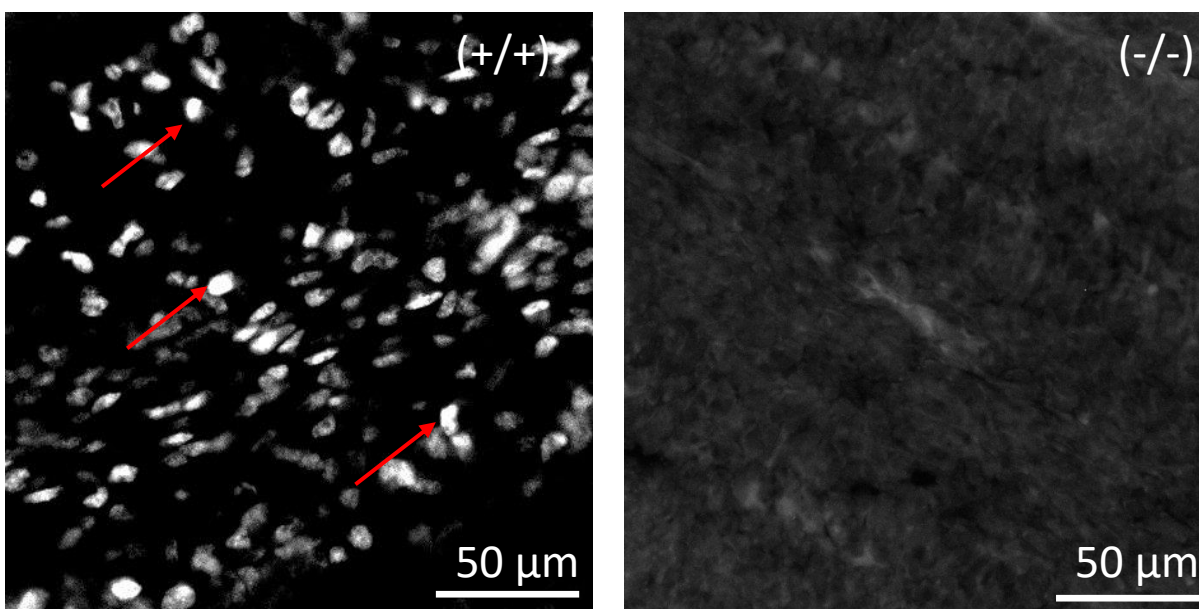
мутанти на възраст P12. Статистически достоверна разлика установяваме при трето, шесто и седмо малкомозъчно фолио ($p < 0,05$). При тях по-голям брой Olig2 – имунопозитивни клетки се установяват при мутанти, в сравнение с индивидите от див тип. При останалите малкомозъчни фолия не се установява статистически достоверна разлика. Анализирахме и средното количество олигодендроцити за всички фолия на възраст P12. Не установихме статистически достоверна разлика между индивидите от див тип и хомозиготните мутанти ($p = 0,22$). При индивидите от див тип установихме 12 клетки, а при мутантите 14 клетки.



Фиг. 26 – Изображения от областта на трето малкомозъчно фолио на контрола (+/+) и хомозиготен мутант (-/-) на P12, демонстриращи експресия на невроглиалния маркер Olig2. Позитивните клетки (стрелки) са оцветени в червено. Увел. x40.

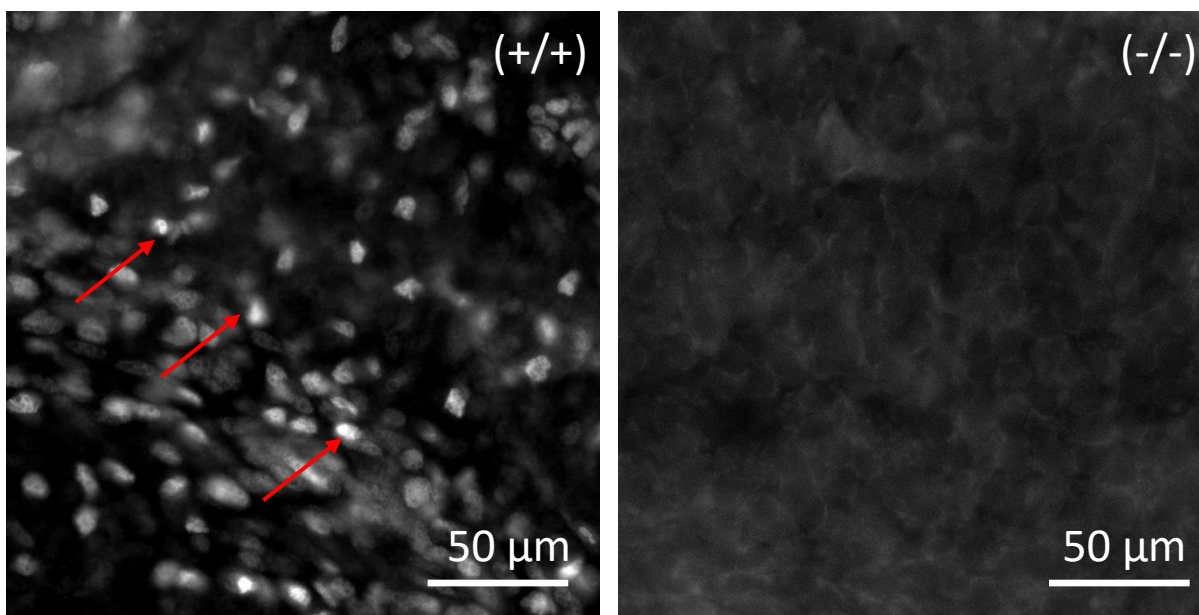
За да определим дали има експресия на Zbtb20, проведохме имунофлуоресцентно изследване с този маркер на трите възрастови периода (P4, P8 и P12) при мишки от див тип и при мутанти. При мишките от див тип установихме експресия на този маркер, докато при хомозиготните $Zbtb20^{-/-}$ мишки не установихме експресия на маркера. На възраст P4 проведохме изследване по малкомозъчни фолия в области на изследване с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Най-голям брой клетки при мишките от див тип установяваме при шесто и седмо фолио

– 39 клетки. При мутанти не установяваме наличието на Zbtb20 – имунореактивни клетки. Статистически достоверна разлика между индивиди от див тип и мутанти се установява при всички малкомозъчни фолия ($p < 0,05$).



Фиг. 27 - Експресия на Zbtb20-имунореактивност на възраст P4. Позитивни клетки се наблюдават само при мишки див тип (+/+), докато срезите от малък мозък на нокаут мутантите (-/-) са негативни. Увел. x40.

На възраст P8 проведохме изследване по малкомозъчни фолия в области на изследване с площ от $10000 \mu\text{m}^2$. Най-голям брой клетки при мишките от див тип установяваме при трето фолио – 27 клетки. При мутанти не установяваме наличието на Zbtb20 – имунореактивни клетки. Статистически достоверна разлика между индивиди от див тип и мутанти се установява при всички малкомозъчни фолия ($p < 0,05$).



Фиг. 28 – Zbtb20-имунореактивни клетки в контролни животни на възраст P8 се наблюдават само при мишки от див тип (+/+). Нокаут мутантите (-/-) не експресират транскрипционния фактор. Увел. x40.

На възраст P12 проведохме изследване по малкомозъчни фолия в области на изследване с площ от 10000 μm^2 . Най-голям брой клетки при мишките от див тип установяваме при второ фолио – 36 клетки. При мутанти не установяваме наличието на Zbtb20 – имунореактивни клетки. Статистически достоверна разлика между индивиди от див тип и мутанти се установява при всички малкомозъчни фолия ($p < 0,05$).

ИЗВОДИ

1. В постнаталния период, и по-точно на P4, P8, P12 и P30, Zbtb20 се експресира от невроглиялните клетки (олигодендроцити, Бергманова глия и астроцити). Невроните не експресират Zbtb20.
2. Транскрипционният фактор Zbtb20 повлиява развитието на малкомозъчните фолия. При липса на Zbtb20 се наблюдават допълнителни нагъвания в някои от малкомозъчните листа на възраст P4, P8 и P12.
3. Zbtb20 не регулира размера и площта на малкия мозък в постнаталния период.

4. Zbtb20 повлиява селективно количеството на пролифериращи клетки в малкия мозък. Липсата на транскрипционния фактор води до значимо завишаване процента на Ki67-позитивните клетки във фолиа 4-5, 6 и 10 на P12.
5. Липсата на Zbtb20 повлиява пролиферацията на клетките на Пуркиние избирателно във времеви и локализационен аспект: на P4 при мутантите се наблюдава завишен както общият брой клетки, експресиращи СВ в $10000 \mu\text{m}^2$, така и селективно, във фолиа 3, 8, 9 и 10; на P8 има повишен брой клетки на Пуркиние само във фолиа 3 и 10; на P12 този ефект липсва и дори във фолио 10 броят на клетките на Пуркиние бе значително по-нисък от този при контролите.
6. Липсата на Zbtb20 не променя общия брой зърнести клетки (Pax6^+), но води до значителното им редуциране във фолиа 6 и 10 на P12.
7. Zbtb20 вероятно потиска развитието на външния зърнест слой избирателно в определени участъци от кората: на P12 при мутантите дебелината на слоя е по-голяма във фолио 4-5, 9 и 10.
8. Транскрипционният фактор Zbtb20 вероятно повлиява върху миграцията на зърнестите глутаматергични неврони от външния зърнест слой към вътрешния зърнест слой към P12. Липсата на този фактор се свързва със забавена миграция на тези неврони към вътрешния зърнест слой.
9. Zbtb20 не регулира дебелината на молекулярния и вътрешния зърнест слой.
10. Zbtb20 не повлиява пролиферацията на униполярните четковидни неврони (CR^+) в постнаталния малък мозък.
11. Zbtb20 не повлиява пролиферацията на клетките на Голджи (Pax2^+) след раждането.
12. Zbtb20 не участва в регулиране пролиферацията на възбудни интерневрони (Tbr2^+) в малкия мозък.
13. Zbtb20 не оказва въздействие върху пролиферацията на астроцитите в малкия мозък в постнаталния период.
14. Zbtb20 избирателно потиска пролиферацията на олигодендроцитите в постнаталния период от развитието на малкия мозък: при мутанти на P12 броят на олигодендроцитите значително е повишен във фолиа 3, 6 и 7.

ОБСЪЖДАНЕ

При проведените от нас изследвания установихме експресия на Zbtb20 в малък мозък на мишки от див тип. На тридесети ден след раждането този маркер се експресира от невроглиалните клетки (олигодендроцити, Бергманова глия и астроцити). Невроналната клетъчна популация не експресира Zbtb20. Доколкото ни е известно от достъпната литература, подобно изследване за ролята на Zbtb20 и неговата експресия в областта на малкия мозък досега не е провеждано.

Установено е, че изоформи на VTB/POZ домейна на Pax имат роля за развитието на невроните на хипокампа, зърнестите неврони на малкия мозък, невроглиалните прогенитори, както и за диференцираната невроглия. Тези изоформи се наричат HOF^L и HOF^S. HOF временно се експресира по време на постнаталния живот в зърнестия слой на малкия мозък. Към P15 HOF се експресира в малка клетъчна популация от молекулярния слой, клетки, които тапицират меката мозъчна обвивка. Към P20 експресията на HOF във вътрешния зърнест и молекулярния слой рязко намалява. Тези данни показват, че HOF преходно е свръхрегулиран при ядрата на мигриращите прекурсори на зърнестите неврони. С матurationта на зърнестите неврони във вътрешния зърнест слой, експресията на гена рязко спада (Mitchellmore, Cathy et al., 2002).

Zbtb20 се експресира на E9.5 в сомитите, а от E10.5 нататък в невралната тръба и развиващия се скелет (Ikeya and Takada 2001). Този транскрипционен фактор определя диференциацията на GABA-ергичните и глиалните стволови клетки на малкия мозък. GABA-ергичните неврони в малкия мозък са сравнително голяма клетъчна популация. Тя включва клетките на Пуркиние, инхибиторни интерневрони на малкомозъчните ядра, звездовидните и кошчевите клетки и клетките на Голджи. При заболявания, свързани с развитието на ЦНС, се установяват мутации на Zbtb20. Счита се, че те оказват влияние върху функцията на невроните, които са от значение за заучаването, паметта и поведението. Такива заболявания са аутизъм и синдрома на Primrose (Casertano A, Fontana P, et al. 2017). Свръхекспресията на транскрипционния фактор причинява дефекти в образуването на кортикалните слоеве, а понижената функция води до намалена дендритна арборизация (Xie Z, Ma X, et al. 2010).

Мутациите на Zbtb20 повлияват по различен начин синаптичната структура (Kelly A Jones, Yue Luo, et al. 2018). Вариантът P46R, за който е доказано, че е свързан с риск от аутизъм,

променя размера на дендритите, което предполага роля за N-края на Zbtb20 в регулиране на синаптичната структура. Вариантът G346V индуцира разширяване на базалната част на дендритите, а вариантът A620V води до разширяване в терминалната област. Мутация без C-терминален домен променя апикалната и базална част на дендритите. Предполага се, че модулирането на апикалната или базалната дендритна арборизация може да промени синаптичните контакти на даден неврон и да доведе до нарушено неврологично развитие (Jan YN, Jan LY, 2010).

Варианти на един и същ протеин могат да допринесат за различни болестни състояния чрез нарушаване на невроналната структура или синаптичните контакти по специфичен начин. Семейство протеини, съдържащи ВТВ домейн контролира израстването на аксона (Kim TA, Jiang S, et al. 2005). Фините промени в дендритната или синаптичната структура могат да доведат до огромни промени в обработката на информацията (Chen JL, Nedivi E. 2010). Дендритната морфология и арборизация са детерминанти на невроналната функция и са нарушени при много неврологични заболявания със засягане на поведенческите и интелектуални функции (Li W, Wang F, et al. 2004). Zbtb20 повлиява дендритната и синаптична структура на пирамидните неврони на предния мозък. Генетичните нарушения могат да играят роля в експресията на заболяванията, свързани с развитието на ЦНС (Kelly A Jones, Yue Luo, et al. 2018).

Zbtb20-специфични участъци отсъстват в мозъчни проби от Zbtb20^{-/-} опитни животни. Това потвърждава липсата на експресия на Zbtb20 в knockout модела. Чрез специфичното антителило за хипокампадни неврони HPA015551 се открива анти-Zbtb20 маркиране изключително в неврони от див тип, а при мутанти такова липсва (Ripamonti S, Shomroni O, et al. 2020). В проведеното от нас изследване върху Zbtb20^{-/-} мишки на P4 и P8 не откриваме Zbtb20 имунопозитивни клетки, а при контролите се наблюдават позитивни клетки. На P12 при контроли установяваме Zbtb20⁺ клетки, а при мутантите не установяваме такива. Тези данни ни дават основание да считаме, че Zbtb20 не се експресира в ранните етапи на постембрионалното развитие при Zbtb20^{-/-} мишки.

При изследване на фолиацията на малкия мозък установихме сходен брой малкомозъчни фолиа при индивидите от див тип и при мутанти на съответната постнатална възраст. На P4, P8 и P12 установихме по десет малкомозъчни фолиа както при индивидите от див тип, така и при мутантни мишки. На P8 и P12 при мутанти в областта на трето, както и в четвърто и

пето фолио наблюдавахме допълнително малкомозъчно подфолио. На P12 подобно допълнително нагъване се появява и при шесто фолио, отново при мутанти. Вероятно това допълнително нагъване се дължи на липсата на транскрипционния фактор Zbtb20. Доколкото ни е известно от литературата, подобно изследване върху Zbtb20^{-/-} мутанти досега не е провеждано.

Изследвана е фолиацията при Shh knockout мутанти. Прекурсорите на зърнестите неврони пролиферират до раждането и малко след това. На този етап не се установява фолиация. Фолиацията при Shh knockout мутанти е с образуването на допълнителни бразди и удължени делчета. Shh не определя позицията на фисурите, нито диференциалното моделиране на вермиса и полукълбата, а е Shh отключващия фактор за фолиацията. Позиционирането на фисурите се определя от взаимоотношението между клетките на Пуркиние и мъховидните влакна, както и от влакната на зърнестите неврони (Corrales, Blaess et al. 2006).

Селективното елиминиране на GCPs в късния ембрионален период или в ранните постнатални стадии при плъхове (Doughty et al., 1998) води до формирането на по-малко на брой фолия. За началните фази на лобуляцията е необходима минимална експресия на Shh (Corrales, 2006). При Shh ^{-/-} мутанти се наблюдава липса на фолиация. При слаба експресия на Shh се наблюдава непълна малкомозъчна фолиация, а при свръхекспресия на Shh - свръхфолиация. Размерът на малкия мозък също се увеличава във връзка с усъвършенстваната фолиация (Corrales, Blaess et al. 2006).

При изследване площта на малкия мозък установяваме, че общата площ на срези на P4, P8 и P12 е сходна при индивидите от див тип и при мутанти. Същевременно с това също на възраст P8 и P12 установяваме допълнителни нагъвания при фолия три, четири и пет. На P12 се появява допълнително подфолио и при фолио шест. Вероятно транскрипционният репресор Zbtb20 повлиява образуването на допълнителни гънки, но не оказва влияние върху размера на малкия мозък. Доколкото ни е известно от литературни данни досега подобно изследване за размера и площта на малкия мозък върху Zbtb20^{-/-} експериментални животни също не е провеждано.

Изследвайки площта на молекулярния слой на P12 установихме, че тя е сходна при мишките от див тип и при мутантите. Това подсказва, че транскрипционният фактор Zbtb20 не повлиява развитието на молекулярния слой в постнаталния период. В достъпната литература няма данни за подобно проучване върху Zbtb20^{-/-} мишки.

От нашите изследвания установихме, че с напредване на възрастта дебелината на външния зърнест слой плавно намалява. Тази закономерност наблюдавахме както при мишки от див тип, така и при мутантни животни. Това се свързва с миграцията на зърнестите неврони от външния зърнест към вътрешния зърнест слой. Доколкото ни е известно, подобно проучване досега не е провеждано върху $Zbtb20^{-/-}$ експериментални животни.

Според (Bovio PP, et al., 2018) при $Dot11^{-/-}$ мишки се наблюдава по-малък по площ външен зърнест слой, както и по-малък брой прекурсори на зърнестите неврони. Също така се появява смущение в пролиферацията и диференциацията на гранулните прогенитори. Това води до по-малък размер на мозъка. При провеждане на тестове за двигателно поведение животните проявяват атаксия.

Изследвайки площта на външния зърнест слой, молекулярния, вътрешния зърнест и слоя на клетките на Пуркиние на P12 установихме, че тя е сходна при мишки от див тип и $Zbtb20^{-/-}$ мутанти. Вероятно транскрипционният фактор $Zbtb20$ не повлиява развитието на тези слоеве на малкомозъчната кора. Подобно изследване досега също не е провеждано.

Ma D et al. (2020) създават модел при мишка със синдрома на Даун и наблюдават намалена дебелина на малкомозъчната кора. Това се дължи на изтъняване на вътрешния зърнест слой. Намалена е и площта на кората, което се дължи на редуцираната площ на молекулярния слой. Според (Landis DM, 1978) от P3 до P21 дебелината и площта на външния зърнест слой при мутантни (*staggerer*) мишки постепенно намалява. Също така броят на постмитотичните зърнести неврони намалява.

Нашето изследване установи, че клетките на Пуркиние на P4 са повече на брой в единица площ при мутанти. На P8 и P12 откриваме сходен брой клетки при мишки от двете експериментални групи. Вероятно в ранния постнатален период транскрипционният фактор $Zbtb20$ транзиторно подтиска пролиферацията и миграцията на клетките на Пуркиние. Доколкото ни е известно от литературата, подобно изследване досега не е провеждано върху $Zbtb20^{-/-}$ мутантни мишки.

Експресията на calbindin (CB) в развиващите се клетки на Пуркиние е сходна при много видове като напр. мишка (Larouche, 2006), плъх (Wierzb-Bobrowicz, 2011), котка (R  sibois, 2004), човек (Milosevic, 1998) и пиле (Pires, 2006). Проучвания върху разпределението на CB имунопозитивните (CB+) клетки на Purkinje при пиле на E8, E10, E12, E14, E16, E18 и E20 показват, че има динамичен и асинхронен модел на разпределение на

имунопозитивните клетки (Gilbert, 2012). Към E10 струпвания на CB⁺ клетки се наблюдават при фолиа II, III/IV, VII и VIII. Най-интензивно е оцветяването при фолиа VII, VIII и IX. След E14 по-голямата част от клетките на Purkinje са CB⁺ с добре изградени тела и отчетливи дендритни израстъци. Към E18 се наблюдава трислойна малкомозъчна кора, при която телата на крушовидните неврони изграждат слоя на Purkinje (Gilbert, 2012).

При изследване на количеството и разпределението на униполярните четковидни неврони установихме, че на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден броят им е сходен при мишки от див тип и при мутанти. Вероятно липсата на Zbtb20 не повлиява пролиферацията на униполярните четковидни неврони в постнаталния живот. Прегледът на достъпната литература показва, че нашето изследване е първото проведено върху Zbtb20^{-/-} мутанти.

Изследвания върху разпределението на CR в малък мозък на Casp1a^{-/-} мишки (Casp1- ген, кодиращ калциевите йонни канали) показват по-слаба експресия при мутанти, в сравнение с контроли (Kim, Niimi et al. 2016). Подобно изследване при RyR1^{-/-} мишки (RyR1- рианодин рецептор 1) установява по-слаба експресия на CR в малкомозъчната кора при мутанти, в сравнение с контролите (Cicale, Ambesi-Impiombato et al. 2002). При плъхове без генни мутации (възраст P12-тридесети месец) не е намерена разлика в експресията на CR в малкомозъчната кора на различните възрастови периоди (Villa, Podini et al. 1994).

При изследванията ни върху развитието клетките на Голджи тип II, установихме, че на P4, P8 и P12 има сходен брой клетки при мишки от див тип и мутанти, с лек превес при контролите и това е първото по рода си проучване върху Zbtb20^{-/-} мутанти. Мишките, при които клетките на Голджи са били селективно инактивирани от вирусни вектори, показват нарушена двигателна координация при сложните движения и това показва ролята им в тази малкомозъчна функция (Watanabe et al. 1998).

Leto et al. (2009) проследяват ранните фази на развитието на интерневроните. За целта те изследват експресията на Pax-2 при мишки див тип, както и GFP флуоресценция в Pax-2-GFP мишки на P2, P6 и P9. В повече от 98% от случаите Pax-2-експресиращите клетки показват морфологични и неврохимични характеристики на интерневрони.

При изследване количеството и разпределението на пролифериращите неврони в малкия мозък установихме, че то е сходно при мишки див тип и мутанти на трите възрастови периода – P4, P8 и P12. Засега това е първото подобно изследване на Zbtb20^{-/-} експериментални животни. Изследване на клетъчната пролиферация при мишки в периода

първа – дванадесета постнатална седмица е правено с прилагане на маркера Ki-67 (Nkomozeri, Mazenganya et al. 2019). Експресия е наблюдавана главно в обонятелната луковица, ростралния миграционен поток, субвентрикуларната зона на страничното мозъчно стомакче, субгрануларната зона на gyrus dentatus, неокортекса и малкия мозък, като тя рязко намалява с напредване на възрастта (Nkomozeri, Mazenganya et al. 2019). Друго проучване установява, че пролиферацията в човешкия малък мозък продължава дълго след раждането; чрез анти-Ki-67 антитяло са открити пролифериращи клетки в EGL до петия месец след раждането.

Динамиката на клетъчната пролиферация се променя по време на цялото развитие. При гризачи позитивирането на EGL леко се увеличава след раждането и се задържа на това ниво за около седмица. Към P12 започва плавно намаляване на пролиферацията, докато слойт изчезне (Seress, 1978). При човека се установява увеличено маркиране между 24-та и 28-та седмица. Това предполага, че първият пролиферативен период продължава до 28-ма седмица. Вторият период продължава до 38-ма – 40-та седмица, когато индексът на имунопозитивиране започва да намалява. Дебелината на EGL остава постоянна до втория постнатален месец, което подсказва, че редуцираната пролиферация се дължи на клетъчна миграция.

Резултатите от нашите изследвания показват същата тенденция и в двете експериментални групи – нарастване броя на пролифериращите клетки на P4-P8, след което на P12 техният брой чувствително намалява. Наблюдавахме известно по-ниско ниво на броя на Ki-67-експресиращите клетки при мутантите във всички възрасти, но тази разлика спрямо контролните животни бе статистически незначима, което подсказва, че Zbtb20 не повлиява съществено пролиферативния процес в малкия мозък.

При нашето изследване количеството и разпределението на астроцитите в развиващия се малък мозък на P4, P8 и P12 бе измервана площта на GFAP⁺ зони в цял срез и бе изчисляван процентът им спрямо общата площ на среза. Разликите между двете експериментални групи бяха незначителни и по двата критерия, но на P4 данните бяха в полза на контролите, докато в по-късните периоди, P8 и P12, резултатите показаха леко превалиране при мутантите. Вероятно транскрипционният фактор Zbtb20 също не въздейства чувствително върху пролиферацията на астроцитите, особено в ранния постнатален период. В достъпната

литература не бяха намерени данни за подобно проучване върху $Zbtb20^{-/-}$ експериментални животни.

Свърхекспресията на $Zbtb20$ *in vitro* или *in vivo* стимулира астроцитогенезата, а липсата на експресия я потиска, тенденция, която бе наблюдавана и при нашето изследване, макар и в по-слаба степен.

Счита се, че $Zbtb20$ регулира ранните етапи на астроцитогенезата в неокортекс. Транскрипционният фактор се експресира в $Aldh1L1$ -GFP+, GFAP+ или $S100\beta$ + астроцити в предния мозък, хипокампуса, сивото и бялото вещество на гръбначния мозък. Експресия има и в невронални прогениторни клетки, изолирани от гръбначен мозък към E11.5. $Zbtb20$ индуцира диференциацията на астроцитите и подтиска тази на невроните и олигодендроцитите в култури от невронални прекурсори на гръбначен мозък. Тези резултати предполагат, че $Zbtb20$ регулира астроцитогенезата в повече области на ЦНС (Nagao et al. 2016).

Данните от нашето проучване кореспондират с тези в литературата. Чрез изключване на гена $Zbtb20$ ние също наблюдаваме известно повишаване броя на олигодендроцитите в малкия мозък, прилагайки маркера $Olig2^{+}$. За отбелязване обаче е фактът, че ние установяваме избирателен ефект върху разпределението на новообразуваните олигодендроцитите, проучване, което не е правено досега. На P12 ние намираме статистически значимо преобладаване на олигодендроцитите в трето, шесто и седмо фолио, което е новост, но какво е значението на този феномен, все още не ни е известно. Отговорът на този въпрос изисква допълнителни изследвания.

Мутацията на един алел от $Zbtb20$ в хетерозиготни hAPP-J20 мишки променя експресията му в някои мозъчни региони, но не и в други. Дефицитите в заучаването, паметта, поведенческите аномалии, дисфункцията на невроналните мрежи, промените в хипокампалните неврони при болестта на Алцхаймер е малко вероятно да са причинени от намалените нива на $Zbtb20$ (Gulbranson et al. 2021).

NeuN се счита за маркер за изследване на невроните. При плъхове албиноси е установена експресия на NeuN при мигриращи зърнести неврони от EGL към IGL, както и при зрелите неврони на IGL в периода P2-P15 (Zimatkin and Karniushko, 2016). Прилагане на хипероксия върху плъхове понижава експресията на NeuN към P30, в сравнение с контролите, което се свързва със загубата на неврони (Scheuer et al., 2018). При опитни животни с мутация на гена

Reelin ($Reln^{-/-}$) експресия на NeuN се наблюдава след P5. Липсва статистически значима разлика между $Reln^{-/-}$ и контроли ($Reln^{+/+}$) (Cocito et al., 2016). Поставянето на плъхове към P7 в условия на повишено O_2 съдържание довежда до понижаване броя на $NeuN^{+}$ клетки, в сравнение с контролите изложени на нормоксия, което доказва увреждащото въздействие на повишеното O_2 налягане върху невrogenезата в малкия мозък (Scheuer, et al. 2018).

Изследвайки броя неврони и тяхното разпределение по фолиа на трите възрастови периода (P4, P8 и P12) чрез този маркер за постмитотични неврони, ние не установихме разлика в броя клетки, експресиращи NeuN, съпоставяйки двете групи опитни животни. Известни различия се наблюдаваха между отделните фолиа, но те нямаха статистическа значимост. Вероятно транскрипционният фактор Zbtb20 не оказва съществено въздействие върху постмитотичните невроните в развиващия се церебелум. Подобно изследване върху $Zbtb20^{-/-}$ опитни животни досега също не е провеждано.

С нашето изследване доказваме за пръв път, че в периода след раждането (P12) в някои от малкомозъчните листа (четвърто, девето и десето) на хомозиготните $Zbtb20^{-/-}$ мутанти се установява по-голяма дебелина на външния зърнест слой, в сравнение с мишки див тип. Вероятно се касае за забавена миграция на гранулните клетки от външния зърнест към вътрешния зърнест слой при хомозиготните мутанти. Това се констатира в области, в които наблюдаваме допълнителни нагъвания на малкомозъчните листа при мутантите (четвърто и пето фолио).

Многобройни проучвания показват, че съществува корелация между развитието и миграцията на зърнестите неврони и нарастването на малкия мозък в периода след раждането. Също така зърнестите неврони се свързват и с разрастването и допълнителните нагъвания на малкомозъчните гънки. Експериментални модели при животни със силно редуциран брой гранулни клетки развиват аномалии във образуването на фолиа и фисури в постнаталния малък мозък (Herrup K., et al. 1987). Направляваната пролиферация на зърнести неврони вероятно участва при детерминиране формата и размера на малкомозъчните дялове (Legué et al., 2015; 2016). развитието на зърнестите неврони се регулира от транскрипционни фактори. Един от тях е Atoh1, който започва своята експресия към E13 в ромбичната устна. При липса на този фактор, зърнести неврони не се генерират и не се формира външен зърнест слой (Van der Heijden et al., 2021).

Образуването на малкомозъчните макроструктури зависи не само от експанзията на клетъчната популация от зърнести неврони, но и от тяхната зрялост. Липсата на чернодробна киназа B1 (Lkb1) води до увеличен размер на малкия мозък и по-голям брой нагъвания на листата, без да се засяга пролиферацията. Наблюдава се бавна радиална миграция на зърнестите неврони (Ryan et al., 2017). Друг механизъм, по който се повлиява фолиацията е неравномерната миграция на гранулните клетки от външния зърнест към вътрешния зърнест слой и в последствие удължаване на малкомозъчните гънки (Takeda et al., 2021). Развитието на малкомозъчните дялове се повлиява и от хромодомен хеликаза ДНК-свързващите протени CHD7 и CHD8. Нарушена функция на CHD7 се свързва със синдрома на CHARGE, а тези на CHD8 със заболявания от аутистичния спектър. Делецията на CHD8 в прекурсорите на зърнестите неврони се асоциира с дефекти във фолиацията поради преждевременна диференциация на зърнестите неврони (Chen et al., 2022). При CHD7^{-/-} експериментални животни се наблюдават намален брой малкомозъчни листа по предно-задната ос (Reddy et al., 2021). При делеция на CHD7 не се променя пролиферативната способност на прекурсорите на зърнестите неврони, както и тяхната миграция. Единствено се променя оста на миграция от предно-задна към медно-латерална. Следователно оста на разпространение на тези клетки е важен фактор за малкомозъчната фолиация (Legué et al., 2015; Lejeune et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Централната нервна система е сложно организирана структура, функционираща благодарение на взаимодействието между милионите неврони и невроглиални клетки. За съвременната наука интерес представлява сигнализацията и нормалното развитие на невроните и глията, както и молекулните механизми, които ги определят. Независимо, че днес се счита, че са изяснени молекулярните механизми, отговорни за развитието на невроналните и невроглиални прекурсори в малкия мозък, все пак остават някои загадки, които следва да бъдат разбулени. Така например все още няма разбиране относно механизмите, определящи развитието и диференциацията на деветте типа клетки на Пуркиние. Интерес за невронауката биха представлявали бъдещи проучвания, хвърлящи повече светлина върху възникване на вродени малкомозъчни малформации. Тези състояния биха могли да станат причина за нарушена координация, смущения в походката, както и речеви дефицити. Съществено откритие е истмичния организатор, който секретира Fgf8 и така отключва молекулярните механизми за спецификацията на малкия мозък.

Невроните на малкия мозък произлизат от две основни неврогенни ниши: ромбичната устна и вентрикуларната зона. Генетичен анализ установява, че глутаматергичните неврони са невроните в малкомозъчните ядра, някои от зърнестите неврони и униполярните четковидни клетки. Те произхождат от ромбичната устна и са детерминирани от транскрипционния фактор АТОН1. GABA-ергичните неврони произхождат от вентрикуларната зона и са детерминирани от транскрипционния фактор PTF1a. Те включват клетките на Пуркиние, интерневроните в молекулярния слой, клетките на Голджи и Лугаро и GABA-ергичните неврони на дълбоките малкомозъчни ядра.

Натрупаните знания през последните години като че ли опровергават постулата, че малкият мозък е ангажиран единствено с моторната функция на организма. Все повече данни се натрупват относно важната му роля и при поведенческите модели. И тук молекулярните механизми все още са неустановени. Имайки предвид бързия растеж на малкия мозък в периода около раждането, той е предразположен към смущения в развитието. Тази уязвимост се дължи на обширните връзки между него и кората на крайния мозък. Смущения по веригата кора на крайния мозък-малък мозък могат да доведат до възникването на психиатрични заболявания още в ранна детска възраст.

Нашето изследване внесе известна яснота относно ролята на някои транскрипционни фактори в развитието на малкия мозък. Главният акцент бе върху транскрипционния фактор Zbtb20. Установихме, че той оказва влияние върху нагъването на малкомозъчните листа по време на развитието, повлиява размера на новоформиращия се малък мозък, оказва въздействие върху развитието на униполярните четковидни неврони, клетките на Голджи, астроцитите и олигодендроцитите. Бъдещи по-обширни изследвания върху проблемите, засегнати в този дисертационен труд, както и включването на неизследвани досега транскрипционни фактори, регулиращи формирането на малкия мозък и при човека, биха допринесли не само за по-пълното разбиране механизмите на нормалното развитие, но и на тези, водещи до патологични изменения в тази толкова важна част от нервната система.

Приноси на Дисертационния труд

Оригинални приноси

1. За първи път се прави количествен анализ на клетките на Пуркиние върху малък мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
2. За първи път се прави количествен анализ на униполярните четковидни неврони върху малък мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
3. За първи път се прави количествен анализ на клетките на Голджи върху малък мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
4. За първи път се прави анализ на количеството и разпределението на зърнестите неврони в малкия мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
5. За първи път се прави анализ на астроцитите върху малък мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
6. За първи път се прави анализ на количеството и разпределението на олигодендроцитите в малкия мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
7. За първи път се прави анализ на пролифериращите клетки върху малък мозък на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.
8. За първи път се прави измерване на площта на малкия мозък, както и на отделните му слоеве – молекулярен, външен зърнест, вътрешен зърнест, слой на клетките на Пуркиние. Измерванията са направени върху хистологични препарати на *Zbtb20*^{-/-} мишки на четвърти, осми и дванадесети постнатален ден.

Публикации във връзка с Дисертационния труд

Iskren Velikov. Transcription factors in cerebellar development. *Trakia Journal of Sciences*, Vol.21, 2023, №3 (257-265). doi:10.15547/tjs.2023.03.007

Участия в научни форуми във връзка с Дисертационния труд

Velikov I.B., Stoyanova I.I., Tonchev A.B. Role of transcription factor Zbtb20 in the cerebellar morphogenesis. *XXIV Congress of BAS, May 31- June 2, 2019, Stara Zagora, Bulgaria*

Velikov IB, Stoykova A, Tonchev AB, Stoyanova II. Role of the transcription factor Zbtb20 in the cerebellar cortex development. *Black Sea symposium for Young Scientists in Biomedicine, November 22- 24 2019, Varna, Bulgaria*

Velikov IB, Stoykova A, Tonchev AB, Stoyanova II.

Role of Doublecortin in the cerebellar cortex development in Zbtb20-knockout mice, *XI International symposium on Clinical Anatomy, Varna, Bulgaria, 2-4 October 2020*

Velikov IB, Stoykova A, Tonchev AB, Stoyanova II.

Calbindin expression in the cerebellar cortex of Zbtb20 knockout mice, *XI International symposium on Clinical Anatomy, Varna, Bulgaria, 2-4 October 2020*

Velikov IB., Programmed cell death in Zbtb20 knockout mice. *XXV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation 28 – 30 May 2021 Pleven, Bulgaria*

Velikov I.B., Stoyanova I. I., Stoykova A., Tonchev A.B., Pax2 expression in developing cerebellum of Zbtb20^{-/-} mice. *Black sea neurogenesis, Varna, Bulgaria, May 26-28, 2022*

Благодарности

Изказвам своята благодарност на моите родители – Красимира и Боян Великови за безусловната им подкрепа през тези шест години работа върху Дисертационния ми труд.

Изказвам благодарност на научния си ръководител – Професор Д-р Ирина Стоянова – ван Дер Лаан за подкрепата ѝ, насоките и ценните съвети по време на моето обучение в докторската програма.

Изказвам своята благодарност на Професор Д-р Анастасия Стойкова за предоставените хистологични препарати.

Изказвам благодарност на Професор Д-р Антон Тончев за методичните насоки през нашата дванадесетгодишна съвместна работа.

Изказвам своята благодарност на Ръководител катедра „Анатомия и клетъчна биология“ – Доцент Д-р Стоян Павлов за насоките по техническите въпроси, които ми е давал.

Изказвам своята благодарност на Д-р Димо Стоянов, д.м. и Д-р Лора Велева за подкрепата им при изготвянето на някои от хистологичните препарати и заснемането им.

Изказвам своята благодарност на лаборантките Велина Кеновска, Йорданка Янева, Светла Костадинова и Елена Боева † за техническата им подкрепа при изготвянето на хистологичните препарати.

Изказвам благодарност към екипа на Max Plank Institute в гр. Гьотинген (Германия), допринесли за отглеждането на $Zbtb20^{-/-}$ трансгенни мишки и мишки от див тип на възраст P4, P8 и P12.

Изказвам своята благодарност на екипа от Института по Микробиология на БАН. Те допринесоха за отглеждането на мишки от див тип на шестнадесети ембрионален ден, както и на тридесети постнатален ден.