

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

Д-р Веселина Георгиева Жекова

**Количество и фенотип на de novo генерирани
клетки в постисхемичен малък мозък на
възрастни примати**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

Научен ръководител: проф. д-р Ваня Г. Стефовска, дм
Научен консултант: проф. д-р Антон Б. Тончев, дмн

Официални рецензенти: проф. д-р Николай Е. Лазаров, дмн
проф. д-р Ивета А. Коева, дм

Варна, 2019

Дисертационният труд съдържа 147 страници, онагледен е с 81 фигури и 3 таблици. Литературната справка съдържа 247 заглавия, от които 4 са на кирилица, а останалите - на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от катедрения съвет на катедрата по Анатомия и клетъчна биология при Медицински университет – Варна. Тъканите са дарени от проф. д-р Тецумори Ямашима, дм, ръководител на катедрата по Регенеративна неврохирургия при университета в Каназава, Япония. Имунохистохимичните изследвания са извършени в катедрата по Анатомия и клетъчна биология, Медицински университет – Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 05. 04. 2019 г. от 15.00 часа в III аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна на открито заседание на научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение в библиотеката на МУ- гр. Варна.

Съдържание

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | Използвани съкращения | 5 |
| 2. | Увод | 6 |
| 3. | Цел и задачи | 7 |
| 3.1. | Цел | 7 |
| 3.2. | Задачи | 7 |
| 4. | Материали и методи | 8 |
| 4.1. | Експериментални животни | 8 |
| 4.2. | BrdU протокол | 8 |
| 4.3. | Обработка на тъканите | 8 |
| 4.4. | Пероксидазна имунохистохимия | 9 |
| 4.5. | Флуоресцентна имунохистохимия | 10 |
| 4.6. | Анализ на препаратите | 10 |
| 4.7. | Статистическа обработка на данните | 11 |
| 5. | Резултати | 12 |
| 5.1. | Количество и разпределение на новообразуваните клетки в слоевете на малкия мозък при всяка от изследваните групи примати | 12 |
| 5.2. | Сравнение на броя на новообразуваните клетки в отделните части на малкия мозък между изследваните групи | 22 |
| 5.2.1. | Сравнение на броя на новообразуваните клетки в отделните слоеве на малкия мозък между групите животни | 22 |
| 5.2.2. | Сравнение на броя на новообразуваните клетки при едноименните слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума на контролната и исхемичните групи | 31 |
| 5.3. | Сравнение на количеството на Calbindin(+) клетки в малкомозъчната кора между отделните изследвани групи | 35 |
| 5.4. | Фенотип на новообразуваните клетки в малкия мозък във възрастов аспект | 36 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.5. | Фенотип на новообразуваните клетки в малкия мозък след исхемия | 38 |
| 5.6. | Експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 в малкия мозък във възрастов аспект и след исхемия | 42 |
| 6. | Обсъждане | 45 |
| 6.1. | Количество, разпределение и динамика на новообразуваните клетки в малкия мозък | 45 |
| 6.2. | Влияние на исхемията върху пролиферацията в малкия мозък | 45 |
| 6.3. | Фенотипна изява на новообразуваните клетки в малкия мозък | 49 |
| 6.4. | Експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 .. | 53 |
| 7. | Изводи | 55 |
| 8. | Приноси на дисертационния труд | 56 |
| 9. | Публикации във връзка с дисертационния труд | 57 |
| 10. | Участия в научни форуми | 57 |
| | Благодарности | 58 |

1. Използвани съкращения

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ЦНС - централна нервна система

BrdU - 5-bromo-2'-deoxyuridin

DAB - диаминобензидин

EGL - външен гранулозен слой

GABA - гама-аминомаслена киселина

GFAP - glial fibrillary acidic protein

Iba1 - ionized calcium binding adaptor molecule

IGL - вътрешен гранулозен слой

i.v. - интравенозно

NeuN - neuron-specific nuclear protein

PBS - phosphate buffered saline

PSA-NCAM - polysialylated neuronal cell adhesion molecule

SSC - standard sodium citrate

TBS-T - Tris Buffered Saline Triton X-100

TuJ1 - β III-tubulin

2. Увод

Становището, че централната нервна система (ЦНС) губи регенеративните си възможности в зряла възраст се променя през последните десетилетия с откриването на невралните стволови клетки в мозъка при възрастни индивиди като дълго съществуващ източник на неврони и глия. Стволовите клетки осигуряват пластичност за регенерация и промяна във функциите и структурите на нервната система. Невралните стволови клетки при възрастни са отговорни за подържането и възстановяването на различните клетъчни типове на нервната тъкан. Тези функции се контролират от разположените в съседство клетки и различни фактори на екстрацелуларния матрикс.

Мозъчно-съдовите заболявания се характеризират с висока заболяемост, инвалидност и смъртност. Ишемията е най-честият патологичен процес, водещ до увреда на мозъка. Това обуславя големия интерес към механизмите, контролиращи ишемичната мозъчна болест и възстановяването след това. Проучванията на невроналната клетъчна смърт включват многобройни *in vivo* и *in vitro* животински модели на мозъчна ишемия. Изследванията с митотичния маркер 5-бромо-2-деоксиуридин (BrdU) разкриха нови аспекти в постисхемичната клетъчна пролиферация. Има убедителни доказателства, че при глобална мозъчна ишемия реагират не само глиоцитите, но и локалните стволови/прогениторни клетки, намиращи се в *gyrus dentatus* на хипокампалната формация. Тези наблюдения са осъществени върху модели при гризачи, а данните за постисхемична клетъчна пролиферация при примати са оскъдни.

Нашата работна постановка включва модел на глобална мозъчна ишемия при възрастни примати с цел проследяване на количеството и фенотипа на *de novo* генерирани клетки в постисхемичен малък мозък на тези животни. Това би поставило основите на едно по-задълбочено разбиране на механизмите, контролиращи тяхната пролиферация и диференциация. Тези данни биха могли да допринесат за разкриването на нови терапевтични стратегии при неврологични състояния, причинени от ишемия на малкия мозък при човека.

3. Цел и задачи

3.1. Цел

Изследване на количеството, разпределението, динамиката и фенотипа на *de novo* генерирани клетки в кората на постисхемичен малък мозък на възрастни примати с оглед на възстановителните процеси.

3.2. Задачи:

1. Извършване на експериментална мозъчна исхемия върху половозрели маймуни.
2. Инжектиране на BrdU в новородени, едногодишни и половозрели животни от същия вид с различни интервали след исхемията.
3. Хистологична обработка на тъканите и имунохистохимични оцветявания за изтъкване на маркери за клетъчно делене и диференциация.
4. Определяне количеството на BrdU(+) клетки в слоевете на кората и бялото вещество на малкия мозък на животни с различна преживяемост след експериментална мозъчна исхемия в сравнение с контролни животни.
5. Определяне на фенотипната изява на BrdU(+) клетки чрез специфични маркери за клетъчни типове в изследваните групи.
6. Проучване на експресията на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6.
7. Анализ на получените резултати с обобщения и изводи.

4. Материали и методи

4.1. Експериментални животни

Всички експериментални процедури бяха извършени след одобрение и в съответствие с правилата на Комисията по Етика на Института за експериментални животни на Медицинския факултет на Университета в гр. Каназава, Япония. Субекти на изследване бяха половозрели японски маймуни (*Macaca fuscata*) в млада възраст (5-9 год. n=12). За допълнително сравнение бяха включени 2 новородени и 2 едногодишни маймуни.

4.2. BrdU протокол

Тимидиновият аналог BrdU, (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, САЩ) бе разтворен в стерилен физиологичен разтвор (0.9 NaCl), съдържащ 0.007 N NaOH. Всички възрастни маймуни бяха инжектирани петкратно със 100 mg/kg i.v. (1 инжекция на ден) от горепосочения разтвор. Следователно, общата BrdU доза за всяка маймуна беше 500 mg/kg. Новородените и едногодишните животни бяха инжектирани два пъти x 250 mg, новородените през 14 дни, а едногодишните в два последователни дни по 1 инжекция.

Част от групите възрастни маймуни бяха евтаназирани 2 часа след последната инжекция BrdU - краткосрочни групи: D4(-), D4(+), D9(+) и D15(+), а други - след 14 и 35 дни от последната инжекция, направена на 9-ти ден - дългосрочни групи: D23(+) и D44(+). Тъй като BrdU бе инжектиран в 5 последователни дни, продължителността на периода, в който BrdU бе наличен в кръвта, за да се инкорпорира в ДНК (дезоксирибонуклеинова киселина), бе между 2 часа и 39 дни. Новородените животни бяха евтаназирани 2 часа, а едногодишните 33 дни след втората апликация на BrdU.

4.3. Обработка на тъканите

Маймуните бяха евтаназирани чрез ексангвинация, осъществена под обща анестезия. Черепът бе отворен и целият главен мозък бе екстрахиран и подложен на постфиксация в 4% параформалдехид за още 2-3 часа. След това малките мозъци бяха отделени, нарязани на сагитални резени с дебелина

около 5 mm и прехвърлени в разтвор на 30% захароза и 0.1% натриев азид в PBS (phosphate buffered saline) за криопротекция. След завършване на инфилтрацията на тъканите със захароза (демонстрирано с потъването на последните на дъното на съда), тъканни блокчета с размери припл. 2 x 2 cm бяха поставени в среда за криосрези (Optimal Cutting Temperature medium, Tissue-Tek, Sakura Finetech Co, Токуо, Япония) за през нощта и замразени на -70°C. От замразените блокчета бяха нарязани срези с дебелина 40 µm на криомикротом (Leica CM3050). Всеки срез бе последователно поставян в кладенчетата с PBS на съд за клетъчни култури (multi-well plate). В последствие PBS бе заменен с криопротективен буфер съдържащ 25% глицерол и 25% етилен гликол в PBS (Wako, Токуо, Япония), а срезите бяха съхранявани при температура -20°C до началото на оцветяването им.

4.4. Пероксидазна имунохистохимия

Оцветяването за BrdU бе осъществено по индиректния пероксидазен метод, следвайки тристъпна процедура. По време на отделните етапи на оцветяването, срезите плуваха свободно в кладенчета на горепосочените съдове за клетъчни култури. Съответните срези бяха прехвърлени от криопротективния буфер в буфер, съдържащ tris buffered saline, с разтворен в него Triton X-100 (TBS-T), рН 7.4. Оцветяването за BrdU изисква денатурация на ДНК в клетките, за да стане едноверижна, преди инкубацията с първичното антитяло. Това бе постигнато чрез нагриване на срезите на 65°C за 2 часа в разтвор на формамид/2xSSC (standard sodium citrate, стандартен натриев цитрат), последвано от инкубация в 2N HCl за 30 минути на 37°C (Kuhn et al., 1996). След това срезите бяха многократно промити в TBS-T (Tris Buffered Saline Triton X-100) и процедурата продължава с блокиране на ендогенната пероксидаза в разтвор от 1% H₂O₂ в TBS-T за 30 минути при стайна температура на тъмно, последвана от промиване в TBS-T. Неспецифичното свързване на антигените бе подтиснато чрез 5-10% нормален серум от животното, източник на второто антитяло (конски, кози) в TBS-T (този блокиращ разтвор накратко ще бъде означен като TBS-TB). Първичното антитяло бе разрежено в TBS-TB и срезите бяха поставени в така получения разтвор за 36-40 часа на 2-8°C. Впоследствие, срезите бяха трикратно промити в TBS и TBS-T, след което бяха инкубирани в разтвор, съдържащ съответното вторично антитяло (насочено срещу вида на

първичното анти тяло), конюгирано с биотин в TBS-TB за 2 часа на стайна температура. След ново измиване, срезите бяха потопени в TBS-T, съдържащ комплекс авидин/пероксидаза, който е част от кит - ABC Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, САЩ). Реакцията бе визуализирана с разтвор, съдържащ диаминобензидин (DAB) (Sigma) (0.25 mg/mL DAB в TBS) и 0.03% H₂O₂ за 30-60 секунди. Реакцията бе преустановена в дестилирана вода, а срезите бяха поставени на предметни стъкла да изсъхнат за около 12 часа, след което бяха дехидратирани във възходяща редица алкохоли, последвано от обработка с ксилол и покрити с изкуствена смола.

4.5. Флуоресцентна имунохистохимия

Флуоресцентната имунохистохимия също бе осъществена по индиректната методика. Тя се прилага за единично или едновременно представяне на 2 или 3 антигена на същия срез (двойна, респ. тройна имунофлуоресценция). След последователно приложение на първите 2 или 3 антигела за съответните антигени, също последователно бяха приложени вторичните антигела, конюгирани с флуорохроми Alexa Fluor 488, 546, 633 (Molecular Probes, Eugene, OR, САЩ) или TRITC (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, САЩ). Alexa Fluor 488 излъчва в зеления, Alexa Fluor 546 и TRITC – в червения, а Alexa Fluor 633 – в инфрачервения спектър.

Етапите при оцветяването следват хронологията на вече описаната имунопероксидазна методика (вкл. денатурацията на ДНК в тъканите при оцветяване за BrdU) и неспецифично блокиране с нормален серум, без блокиране на ендогенната пероксидаза. Накрая срезите бяха промити в TBS, монтирани върху предметни стъкла и включени във водоразтворим медиум (Vectashield, Vector Labs), съдържащ запазващи флуоресценцията реагенти.

4.6. Анализ на препаратите

Светлинно микроскопският анализ на имунопероксидазните срези бе проведен върху дигитални образи, заснети с микроскоп Axio Imager Z2 Zeiss, с камера AxioCamMRc2 и AxioVision9.1 (софтуерна система Carl Zeiss Microscopy). С помощта на програма Fiji/ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) бе осъществено броенето на BrdU(+) клетки на серийни срези от спиноцеребелум и цереброцеребелум с дебелина 40 µm, разделени на 3-8

области на интерес, за заснемането на които се използва функцията ROI върху компютърен екран. ROI образите бяха разделени още на 3-8 зони за броене. Приложени бяха дигитални рамки с размер 200x200 μm или 100x400 μm за 3 зони на всяко поле от молекуларния слой, гранулозния слой и бялото вещество. Слойт на клетките на Пуркиние беше включен към гранулозния.

Качествен анализ и дигитални снимки на оцветените флуоресцентни срези бяха направени с помощта на лазерен сканиращ конфокален микроскоп LSM700 (Zeiss, Германия) и софтуерна програма Zeiss ZEN.

4.7. Статистическа обработка на данните

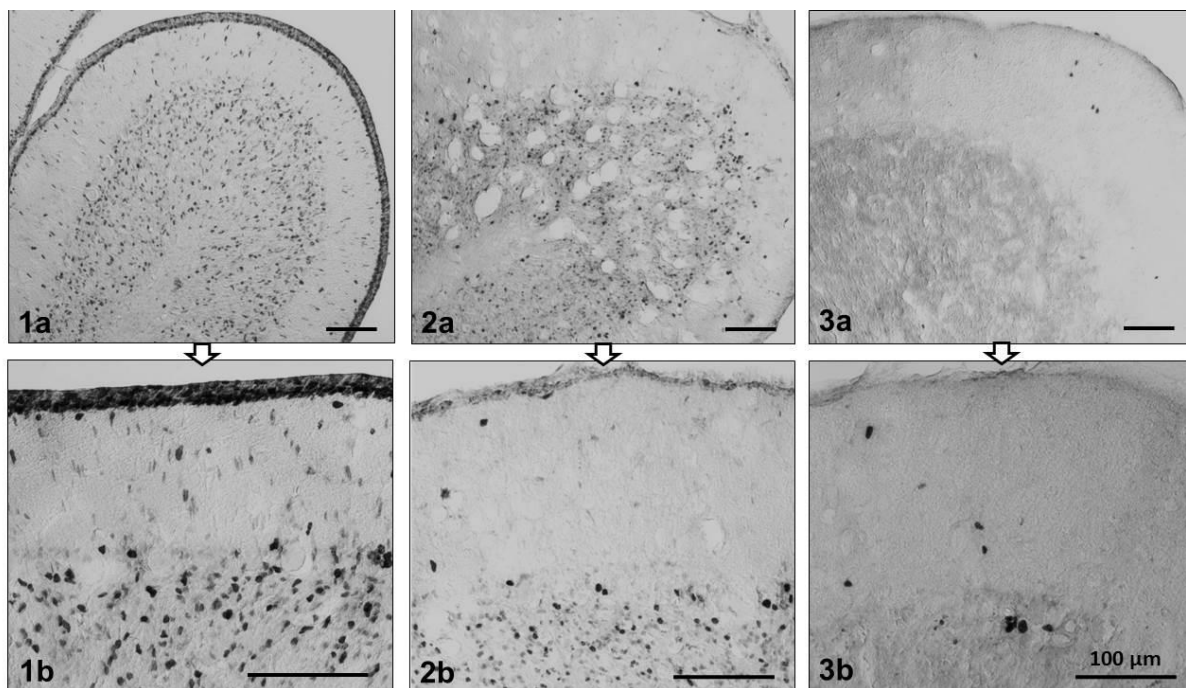
Изброихме новообразуваните клетки в трите слоя на съпоставими зони на малкия мозък, като разделихме пробите на две основни групи според отнасянето им към цереброцеребеларната или спиноцеребеларната област на малкия мозък. Добра възможност за разчертаване на необходимия еднакъв брой полета с избраната от нас площ на дигитална рамка от 40000 μm (200x200 или 100x400) имаше в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество. И в трите слоя на интерес установихме новообразувани клетки, като сравнихме броя им и определихме статистически достоверната количествена разлика на пролиферацията в различните слоеве.

Изброените във всяка дигитална рамка BrdU(+) клетки бяха сумирани по слоеве. Получените резултати бяха обработени и представени графично чрез функцията дескриптивна статистика на MS Excel 2010 с посочено стандартното отклонение за всяка група. За целите на сравнителния статистически анализ използвахме функцията Т-тест на същата програма (t-test: Two - Sample Assuming Equal Variances), чрез който определихме р-величините (интервал на доверителност). За онагледяване на количествената разлика между отделните слоеве или групи опитни животни, за които установихме статистическа значимост означихме по следния начин: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$.

5. Резултати

5.1. Количество и разпределение на новообразуваните клетки в слоевете на малкия мозък при всяка от изследваните групи примати

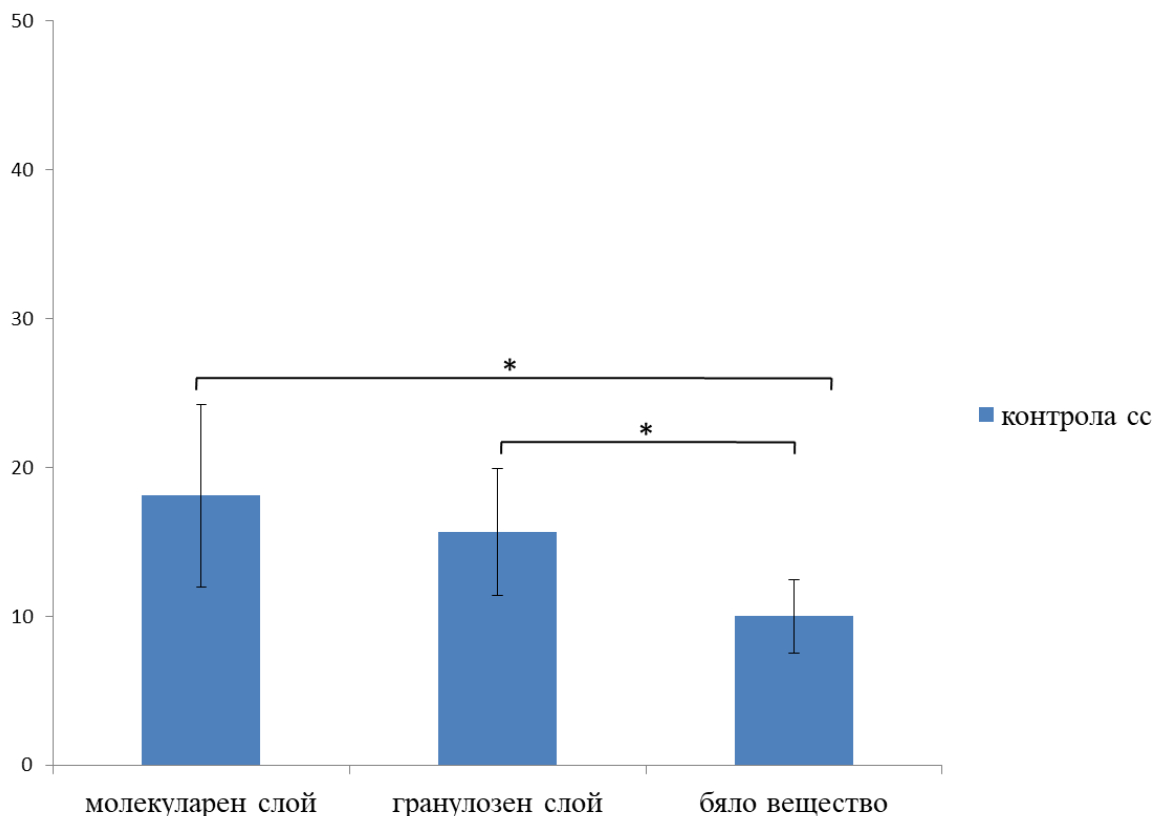
Установихме, че при новородените и едногодишните животни количеството на BrdU(+) клетки е значително по-високо в сравнение с тези при възрастните контроли (Фиг. 5.1).



Фиг. 5.1. Сравнение на количеството BrdU(+) клетки в малкомозъчната кора между новородени (1a,б), едногодишни (2a,б) и възрастни животни (3a,б) в отсъствие на исхемия. Peroксидазна имунохистохимия с DAB.

При пробите от новородени животни се наблюдава добре оформен, клетъчно населен външен гранулозен слой, с интензивно BrdU(+) натрупване в молекулярния и вътрешния гранулозен слой. При едногодишните животни EGL е по-тънък, с отделни островчета от BrdU(+) клетки, а пролиферацията в молекулярния слой и в IGL е много по-ограничена. При възрастните животни няма натрупване на маркера на повърхността на кората, а в подлежащите слоеве има единични BrdU(+) клетки.

При **цереброцеребелума** на контролната група се установяват BrdU(+) клетки във всички слоеве (Фиг. 5.2).



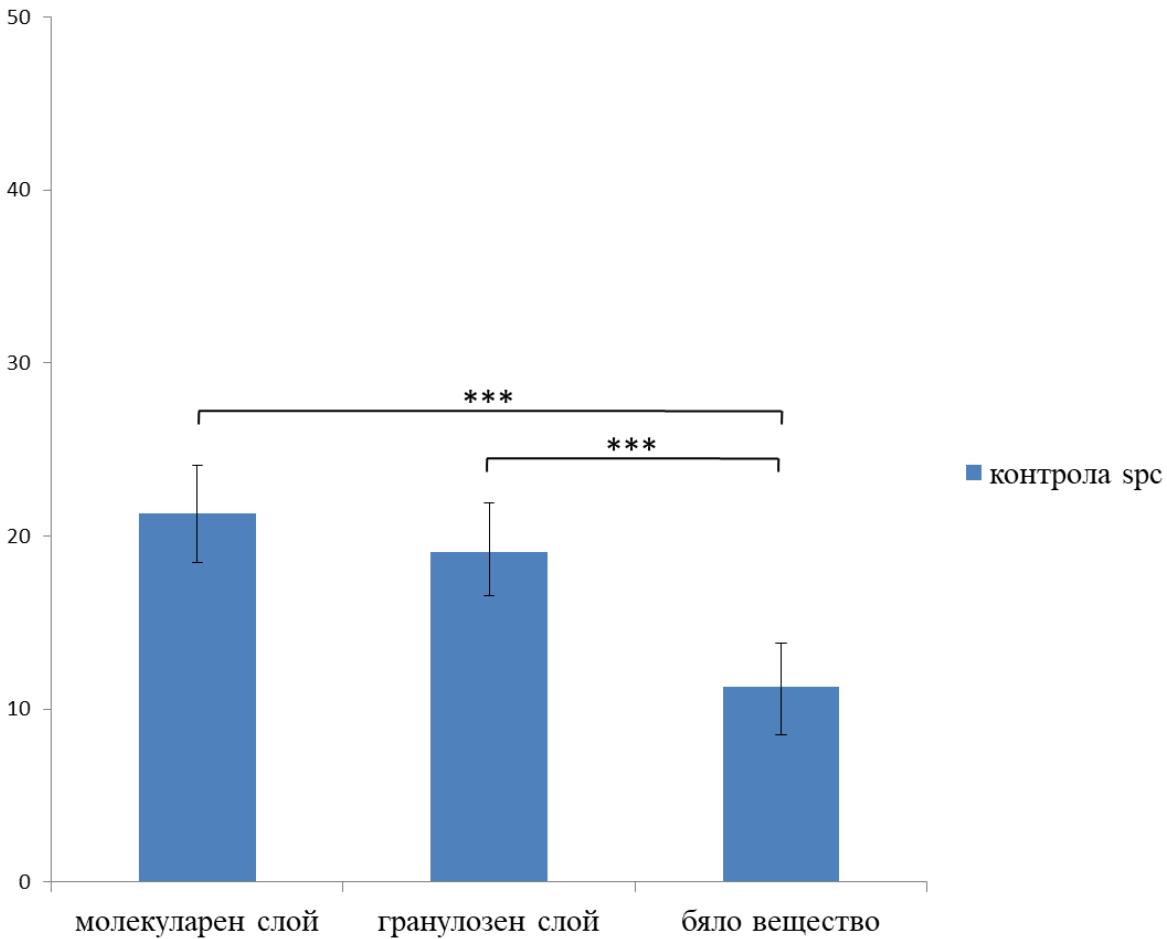
Фиг. 5.2. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D4(-). * $p < 0.05$; сс-цереброцеребелум.

Анализът на данните показва статистически значима разлика между броя новообразувани клетки в молекуларния слой и бялото вещество ($p < 0.05$), както и между гранулозния слой и бялото вещество ($p < 0.05$). Между броя пролифериращи клетки на молекуларния и гранулозния слой не се доказва статистически значима разлика ($p > 0.05$).

При **спиноцеребелума** в контролната група BrdU(+) клетки присъстват в трите слоя (Фиг. 5.3).

Установихме подобна зависимост в броя новообразувани клетки. Има по-голяма статистически значима разлика между молекуларния слой и бялото вещество ($p < 0.001$), както между гранулозния слой и бялото вещество ($p < 0.001$). Между броя пролифериращи клетки на молекуларния

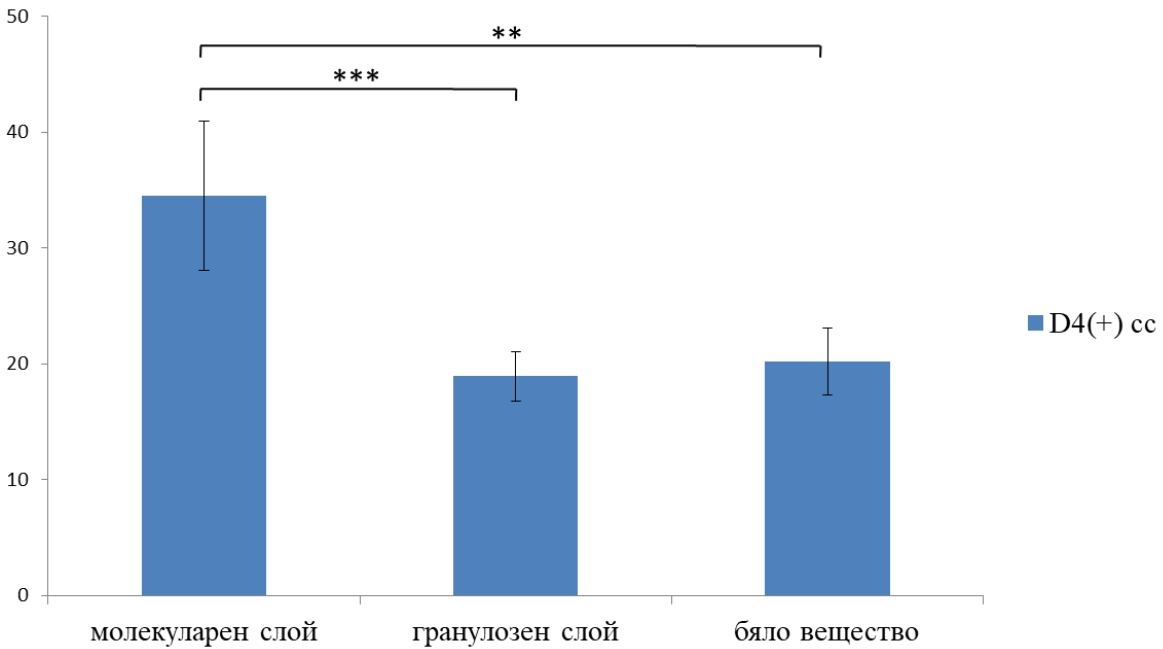
и гранулозния слой липсва статистически значима разлика ($p>0.05$).



Фиг. 5.3. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в спиноцеребелума на малкия мозък при група D4(-). *** $p<0.001$; spc-спиноцеребелум.

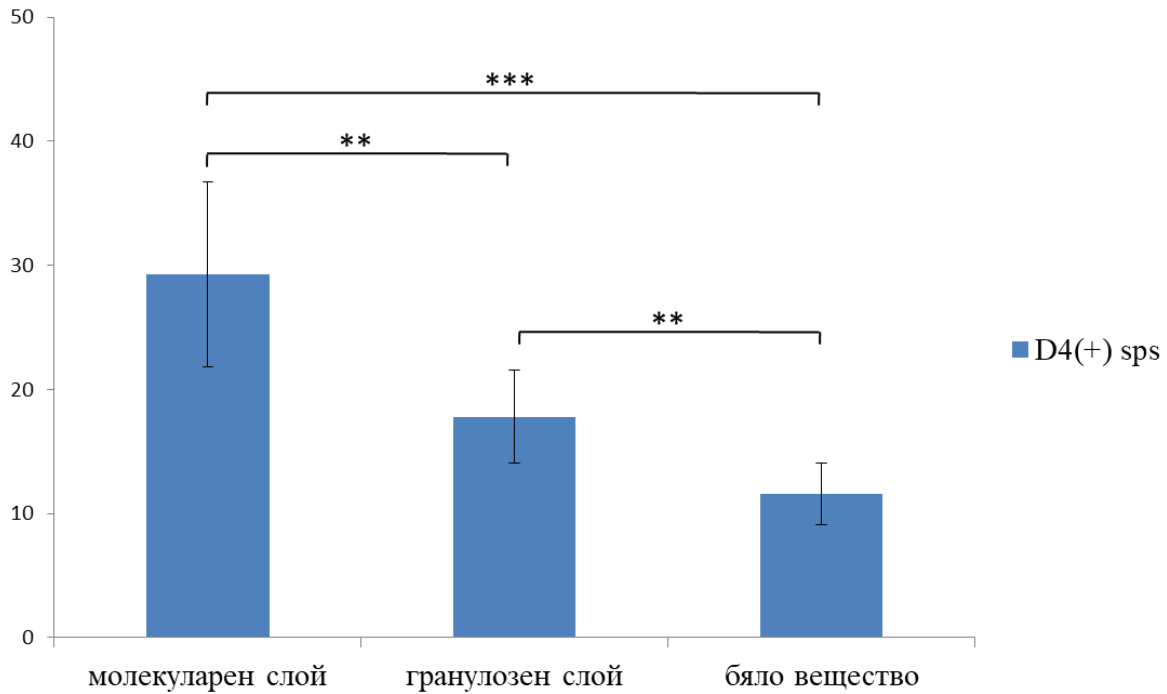
При групите на животни с исхемия получихме следните резултати:

Група D4(+). При **цереброцеребелума** отново присъстват BrdU(+) клетки и в трите слоя (Фиг. 5.4). Има статистически значима разлика в броя пролифериращи клетки между молекуларния и гранулозния слой ($p<0.001$) и между молекуларния слой и бялото вещество ($p<0.01$), но липсва такава между гранулозния слой и бялото вещество ($p>0.05$).



Фиг. 5.4. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D4(+). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; cc-цереброцеребелум.

При **спиноцеребелума** на същата група пролифериращи клетки има и в трите слоя (Фиг. 5. 5).

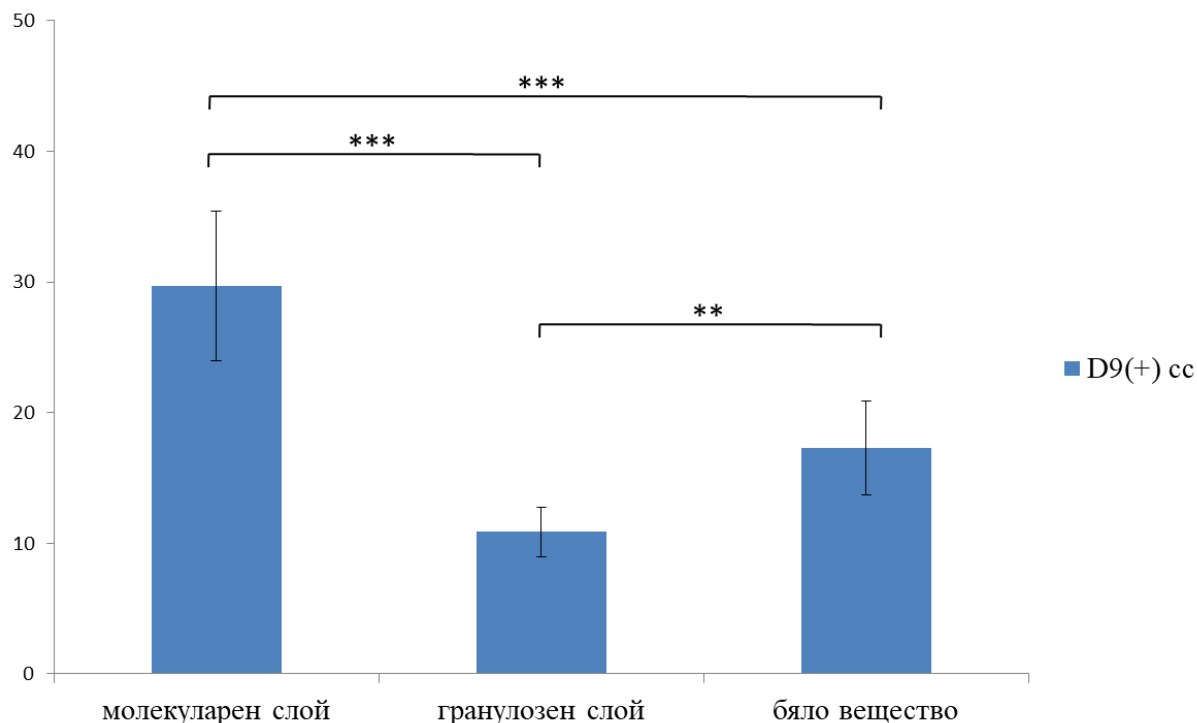


Фиг. 5.5. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в

спиноцеребелума на малкия мозък при група D4(+). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *ср-спиноцеребелум*.

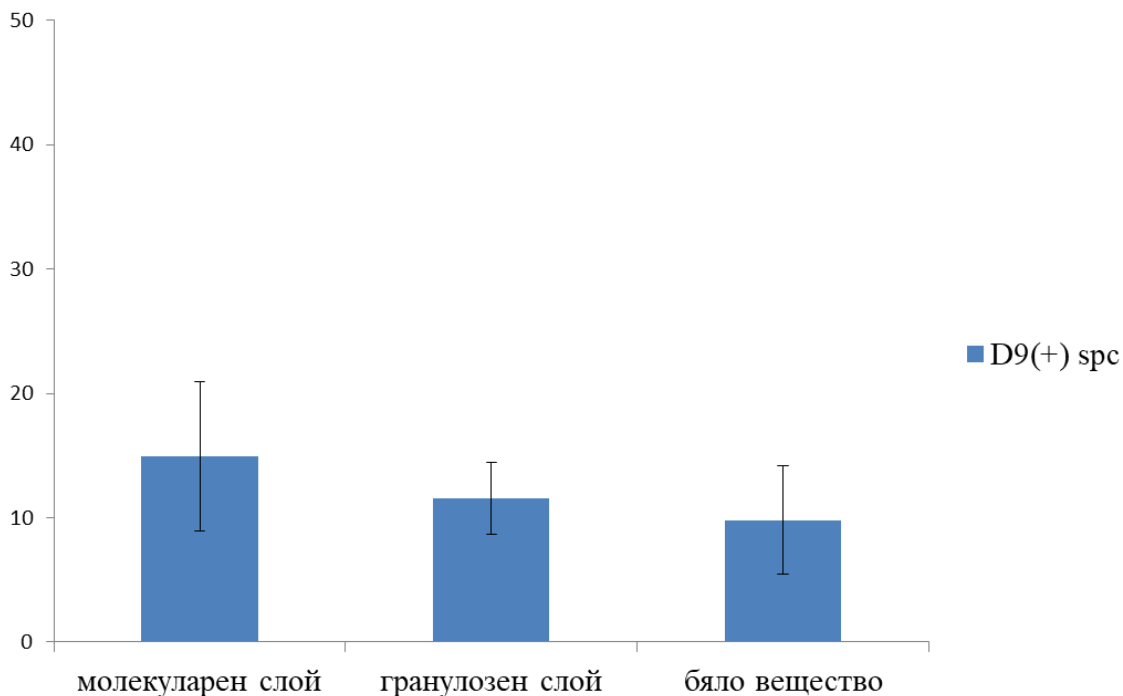
Между молекуларния и гранулозния слой статистически достоверната разлика беше $p < 0.01$, между гранулозния слой и бялото вещество също беше $p < 0.01$, а между молекуларния слой и бялото вещество беше $p < 0.001$.

Група D9(+). При **цереброцеребелума** отново присъстват BrdU(+) клетки и в трите слоя (Фиг. 5.6). Между броя на новообразуваните BrdU(+) клетки съществува статистически достоверна разлика между трите изследвани зони: молекуларния и гранулозния слой ($p < 0.001$), гранулозния слой и бялото вещество ($p < 0.01$) и молекуларния слой и бялото вещество ($p < 0.001$).



Фиг. 5.6. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D9(+). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *ср-цереброцеребелум*.

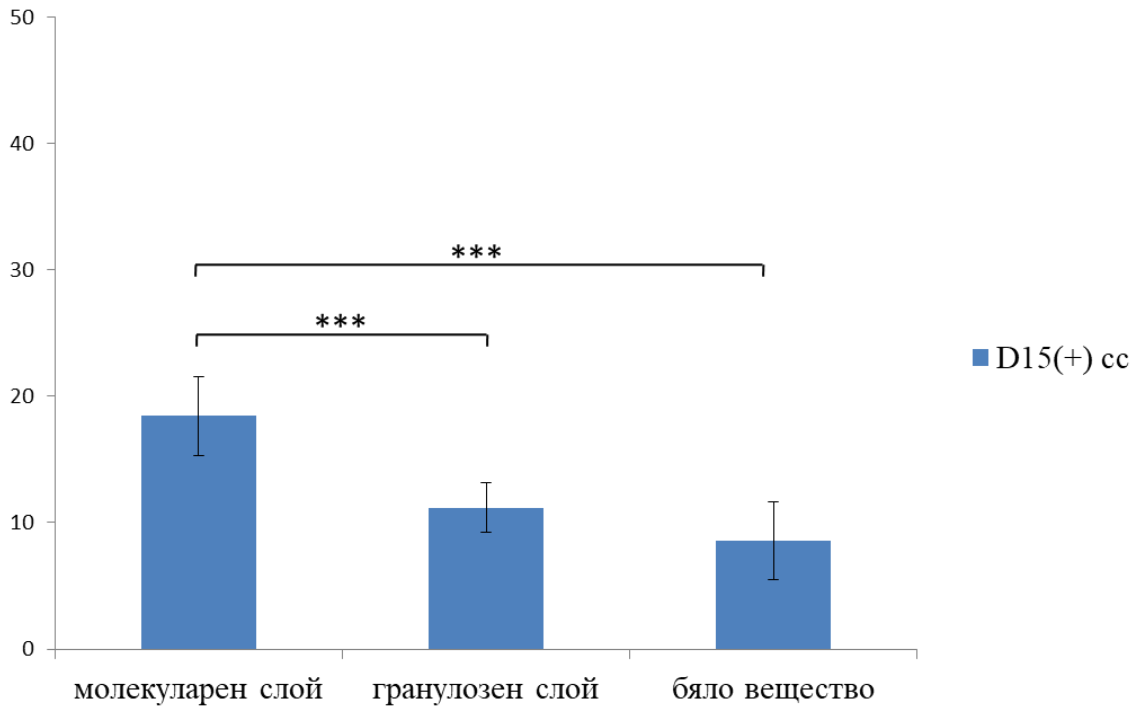
При **спиноцеребелума** на животните от D9(+) група BrdU(+) клетки се откриват и в трите изследвани зони (Фиг. 5.7).



Фиг. 5.7. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в спиноцеребелума на малкия мозък при група D9(+); $p > 0.05$; spc-спиноцеребелум.

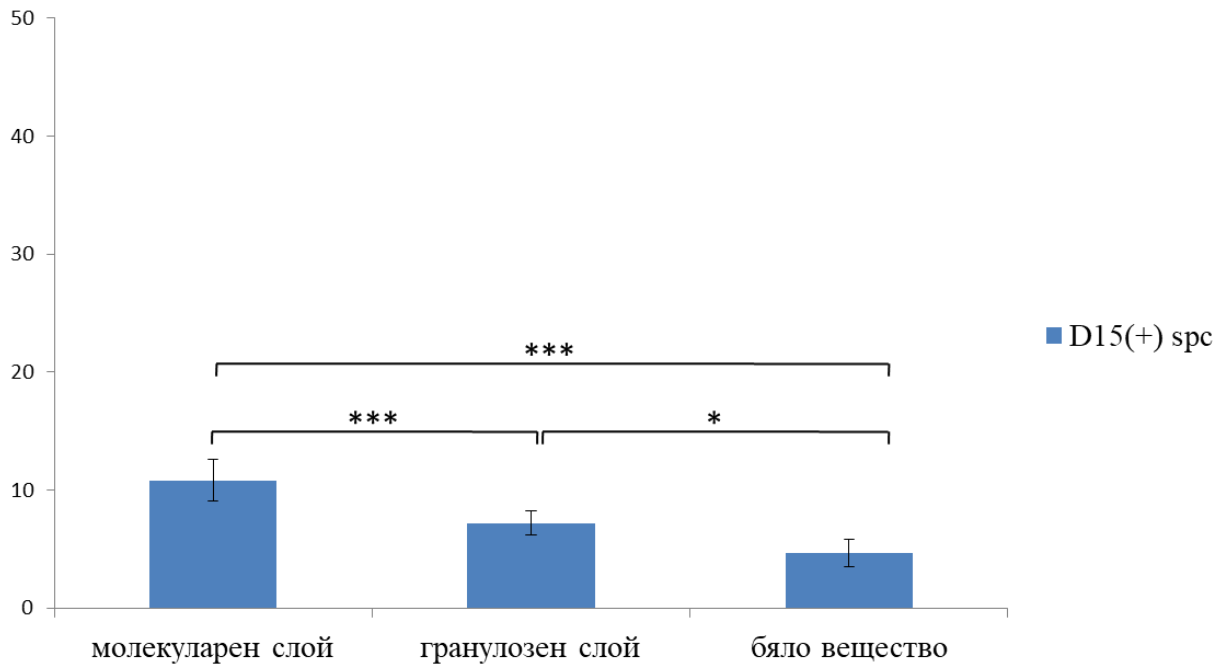
При сравнение между всеки два от слоевете липсва статистически значима разлика в пролиферацията, т.е. $p > 0.05$.

Група D15(+). При **цереброцеребелума** BrdU(+) клетки се намират във всички зони на интерес (Фиг. 5.8). Има голяма статистическа разлика между молекуларния и гранулозния слой ($p < 0.001$), както и между молекуларния слой и бялото вещество ($p < 0.001$), но такава липсва между гранулозния слой и бялото вещество ($p > 0.05$).



Фиг. 5.8. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D15(+). *** $p < 0.001$; cc-цереброцеребелум.

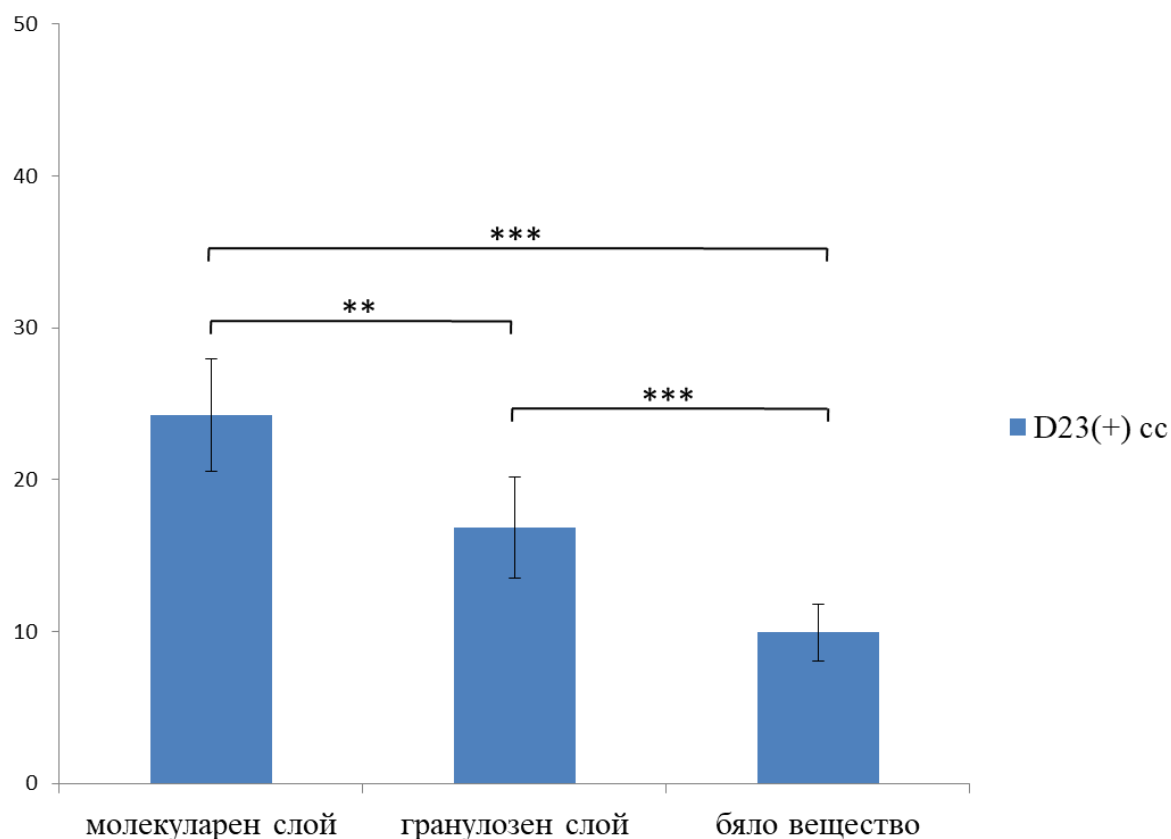
При **спиноцеребелума** установихме BrdU(+) клетки и в трите зони.



Фиг. 5.9. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в спиноцеребелума на малкия мозък при група D15(+); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; spc-спиноцеребелум.

Статистически значима разлика между броя на новообразуваните клетки има при трите сравнения (Фиг. 5.9). Между молекулярния и гранулозния слой статистическата достоверност е $p < 0.001$, между гранулозния слой и бялото вещество е $p < 0.05$, а между молекулярния слой и бялото вещество е $p < 0.001$.

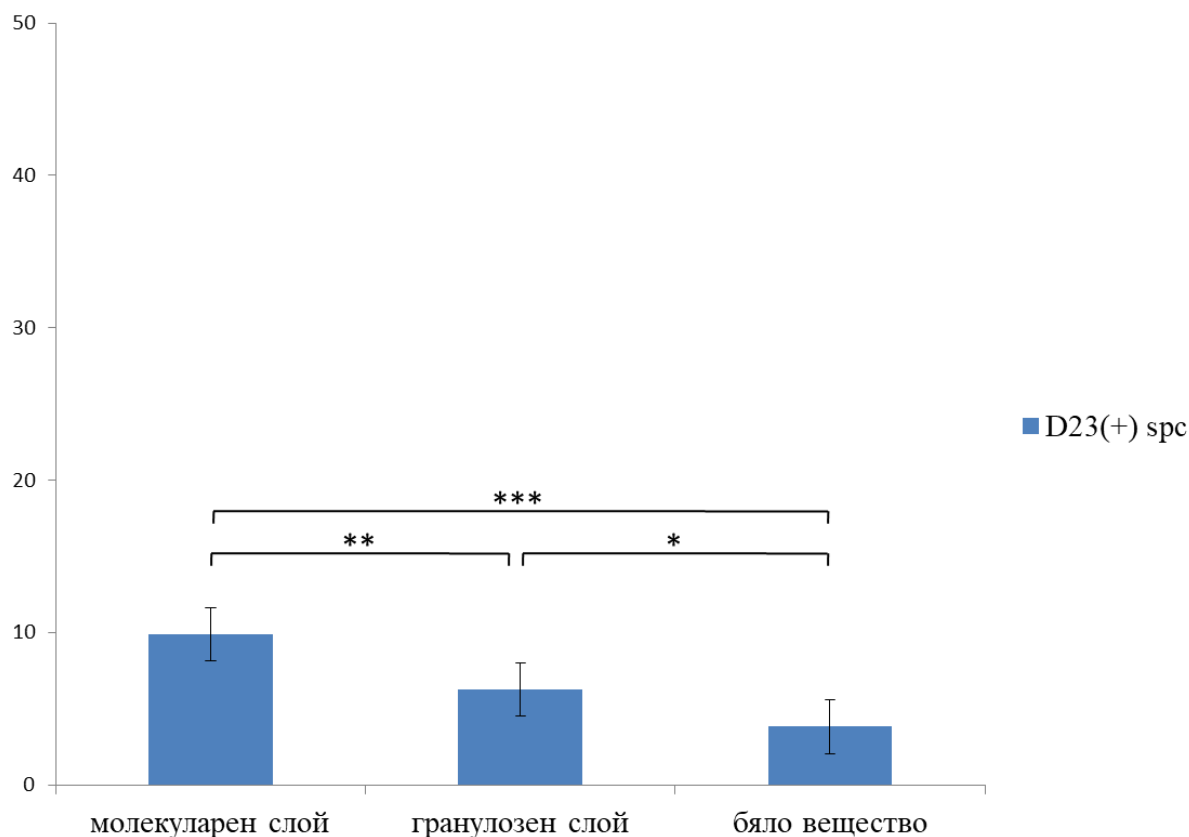
Група D23(+). При **цереброцеребелума** на тази група животни има BrdU(+) клетки в трите зони (Фиг. 5.10).



Фиг. 5.10. Брой BrdU(+) клетки в молекулярния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D23(+); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; сс-цереброцеребелум.

Откриха се достоверни разлики в броя BrdU(+) клетки при сравнение между всеки два слоя на малкия мозък. Между молекулярния и гранулозния слой разликата е $p < 0.01$, между гранулозния слой и бялото вещество - $p < 0.001$, а между молекулярния слой и бялото вещество - $p < 0.001$.

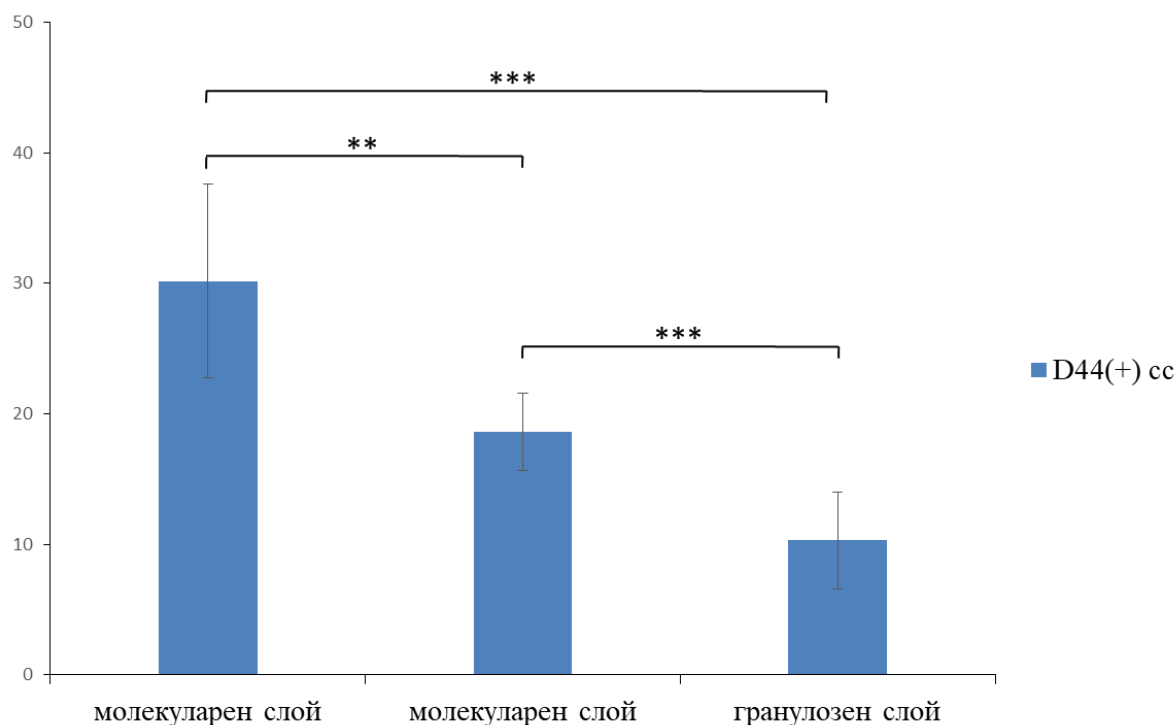
При **спиноцеребелума** наблюдавахме BrdU(+) клетки отново в трите зони (Фиг. 5.11). Получихме статистически значима разлика в броя на новообразуваните клетки и при трите сравнения. Разликата между молекуларния и гранулозния слой е $p < 0.01$, между гранулозния слой и бялото вещество е $p < 0.05$, а между молекуларния слой и бялото вещество е $p < 0.001$.



Фиг. 5.11. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в спиноцеребелума на малкия мозък при група D23(+); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *sps*-спиноцеребелум.

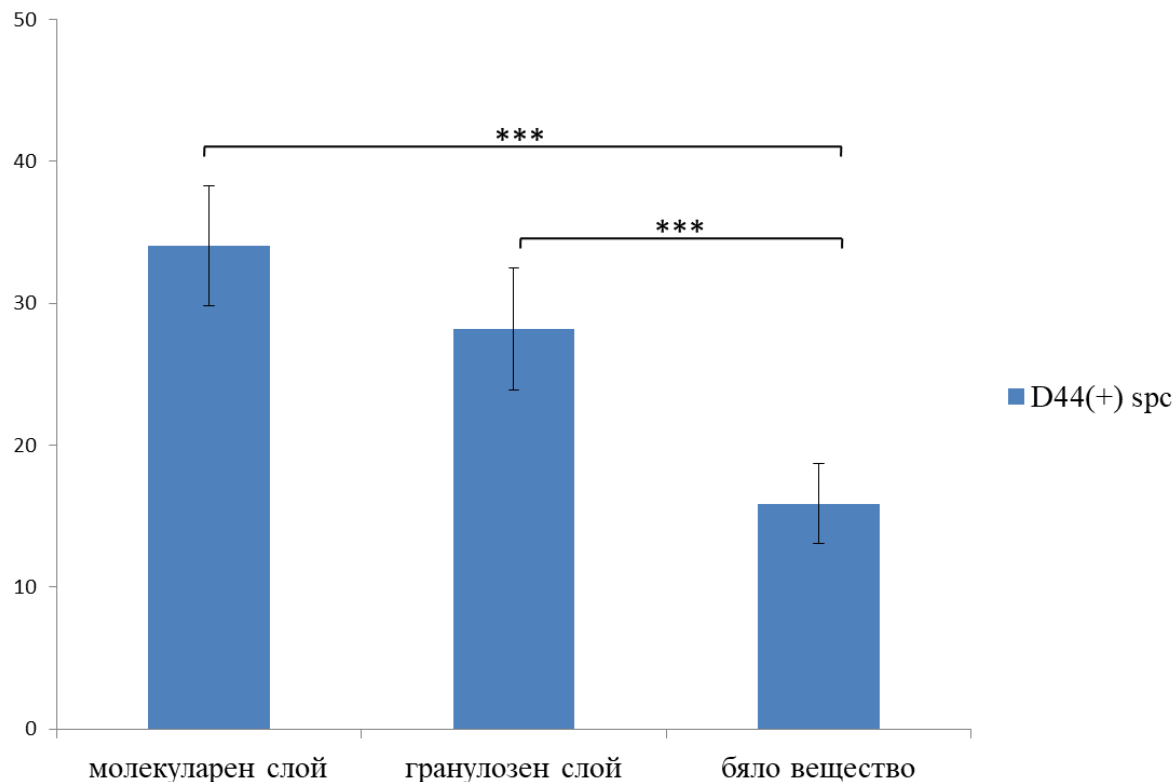
Група D44(+). При тази експериментална група получихме подобна зависимост в броя BrdU(+) клетки при молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество на малкия мозък.

При **цереброцеребелума** (Фиг. 5.12) има статистически значима разлика при сравняване броя на новообразуваните клетки между трите слоя. Между молекуларния и гранулозния слой се отчете достоверна разлика с $p < 0.01$, при гранулозния слой и бялото вещество с $p < 0.001$, а при молекуларния слой и бялото вещество с $p < 0.001$.



Фиг.5.12. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в цереброцеребелума на малкия мозък при група D44(+); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; cc-цереброцеребелум.

При **спиноцеребелума** се наблюдаваха пролифериращи клетки и трите зони (Фиг. 5.13). При сравнение в броя на BrdU(+) клетки интервалът на доверителност беше $p < 0.001$ при молекуларния и гранулозния слой и при гранулозния слой и бялото вещество, а между броя на новообразуваните клетки в молекуларния и гранулозния слой не се намери ($p > 0.05$).



Фиг. 5.13. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество в спиноцеребелума на малкия мозък при група D44(+); *** $p < 0.001$; spc-спиноцеребелум.

5.2. Сравнение на броя на новообразуваните клетки в отделните части на малкия мозък между изследваните групи

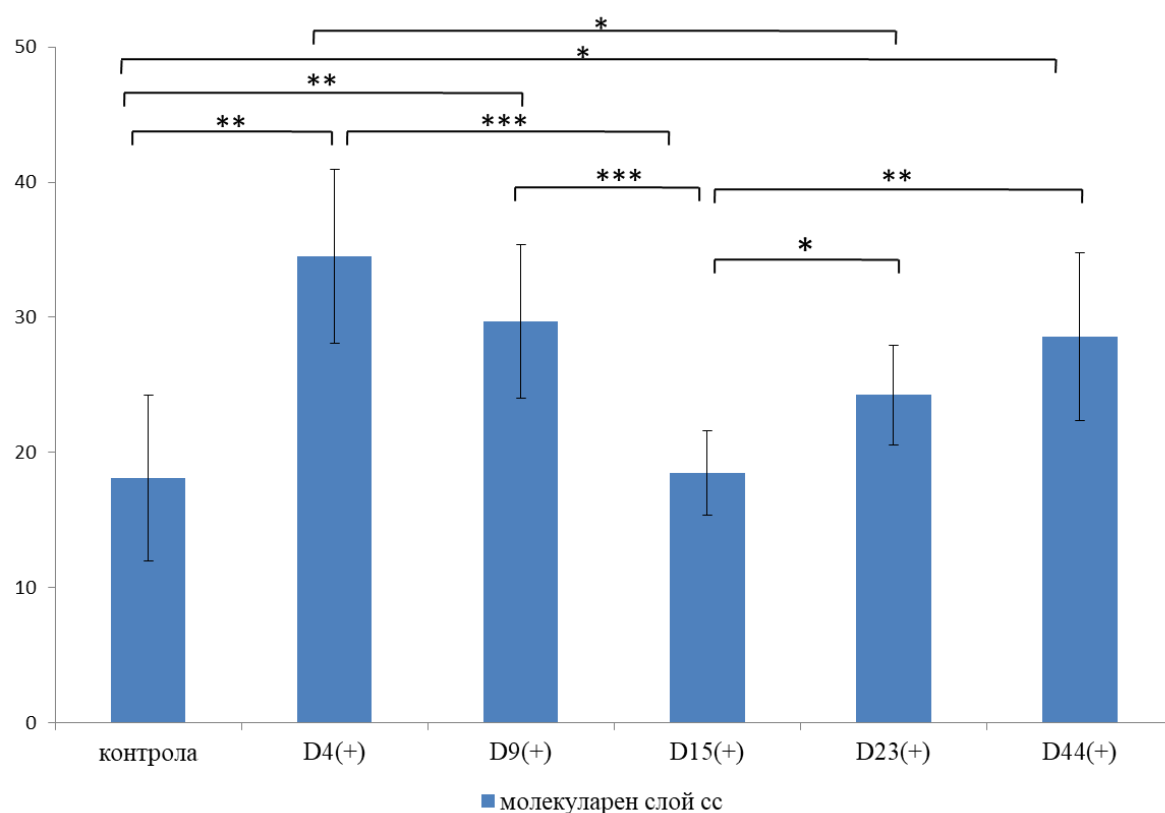
5.2.1. Сравнение на броя на новообразуваните клетки в отделните слоеве на малкия мозък между групите животни

На следващите диаграми, представяме сумарно данните за броя на BrdU(+) клетки във всеки изследван слой на исхемичните групи D4(+), D9(+), D15(+), D23(+) и D44(+), спрямо контролната както и с всяка от останалите групи, съответно в цереброцеребелума и спиноцеребелума.

Молекуларен слой – цереброцеребелум (Фиг. 5.14). При сравнение на контролната група с постисхемичните установихме статистически значима зависимост при D4(+) ($p < 0.01$), D9(+) ($p < 0.01$) и D44(+) ($p < 0.05$) спрямо контролата с най-голямо нарастване на броя новообразувани клетки при D4(+). Между контролните животни и тези от D15(+) и D23(+) няма достоверна разлика в пролиферацията на клетки ($p > 0.05$).

Сравнението на D4(+) групата към контролната група ($p < 0.01$), съответно D15(+) с ($p < 0.001$) и D23(+) с ($p < 0.05$) показва статистически значима разлика, като имаме по-малък брой BrdU(+) клетки при контролата, D15(+) и D23(+). Между животните от D4(+) и D44(+) група няма значима разлика в пролиферацията ($p > 0.05$).

При D9(+) група има значителна разлика спрямо контролата ($p < 0.01$) и D15(+) ($p < 0.01$), като броят новообразувани клетки на 9 ден е измеримо по-голям, за разлика от D4(+) и D44(+), при които пролиферацията не е със значима разлика спрямо D9(+) ($p > 0.05$).



Фиг. 5.14. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния слой на сравняваните групи в цереброцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; сс – цереброцеребелум.

При D15(+) група установихме значимо намаление в пролиферацията спрямо D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.01$), D23(+) ($p < 0.05$) и D44(+) ($p < 0.01$), като D15(+) има най-малък брой новообразувани клетки. Спрямо контролната

група животни разликата в броя новообразувани клетки не показва статистически значима разлика ($p > 0.05$).

При D23(+) група разликата е достоверна при сравнение с D4(+) ($p < 0.05$) и D15(+) ($p < 0.05$), като броят BrdU(+) клетки в молекуларния слой на 23 ден е по-голям от този на 15 ден и по-малък от 4 ден. Спрямо контролната група, D9(+) и D44(+) не се установи достоверна разлика в броя пролиферирани клетки ($p > 0.05$).

При D44(+) група има значима разлика с контролната група ($p < 0.05$) и D15(+) ($p < 0.01$), показвайки по-голям брой новообразувани клетки от контролата и D15(+). Разликата в броя новообразувани клетки между групите D44(+) и D4(+), D9(+) и D23(+) не беше достоверна ($p > 0.05$).

Молекуларен слой – спиноцеребелум (Фиг. 5.15). При сравнение на контролната група с постисхемичните установихме статистически значима зависимост при D4(+) ($p < 0.05$), D9(+) ($p < 0.05$), D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). Броят новообразувани клетки в контролната група е значимо по-голям в сравнение с групите D15(+) и D23(+) и по-малък от D9(+) и D44(+).

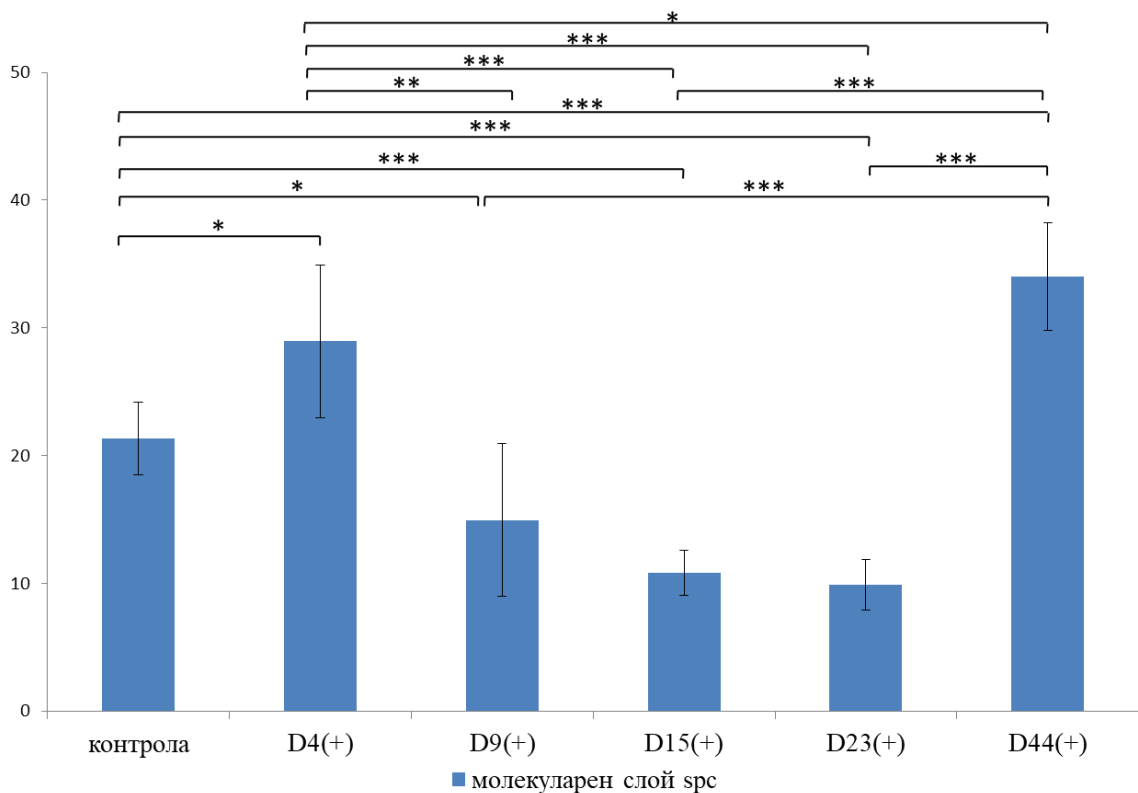
При D4(+) група има статистически значима разлика в броя BrdU(+) клетки в молекуларния слой спрямо контролната група ($p < 0.05$), D9(+) ($p < 0.01$), D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.05$), като спрямо D44(+) е с по-малко новообразувани клетки, а в сравнение с всички останали групи темпът на пролиферация е по-голям.

При D9(+) също намерихме достоверна разлика в пролиферацията спрямо три други групи – контролната ($p < 0.05$), D4(+) ($p < 0.01$) и D44(+), със значимо по-малък брой BrdU(+) клетки за D9(+).

При група D15(+) намерихме подобна зависимост. Достоверна разлика в броя на BrdU(+) клетки спрямо контрола ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$) и спрямо 44 ден ($p < 0.001$) с по-малък брой BrdU(+) клетки за D15(+).

При група D23(+) има подобна достоверна разлика спрямо контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$), с по-малък брой BrdU(+) клетки за D23(+).

При група D44(+) има статистически значимо повишение в броя на новообразуваните клетки спрямо всички други групи от изследването - контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.05$), D9(+) ($p < 0.001$), D15(+) ($p < 0.001$) и D23(+) ($p < 0.001$).



Фиг. 5.15. Брой BrdU(+) клетки в молекуларния слой на сравняваните групи в спиноцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; срс – спиноцеребелум.

Гранулозен слой – цереброцеребелум (Фиг. 5.16). При контролната група се намери статистически достоверна разлика в броя BrdU(+) клетки спрямо D9(+) ($p < 0.05$) и D15(+) ($p < 0.05$), като новообразуваните клетки в контролата са повече от тези за D9(+) и D15(+).

При група D4(+) от животните с глобална исхемия има достоверна разлика в пролиферацията спрямо D9(+) ($p < 0.001$) и D15(+) ($p < 0.001$), като в D4(+) има значително по-голям брой BrdU(+) клетки.

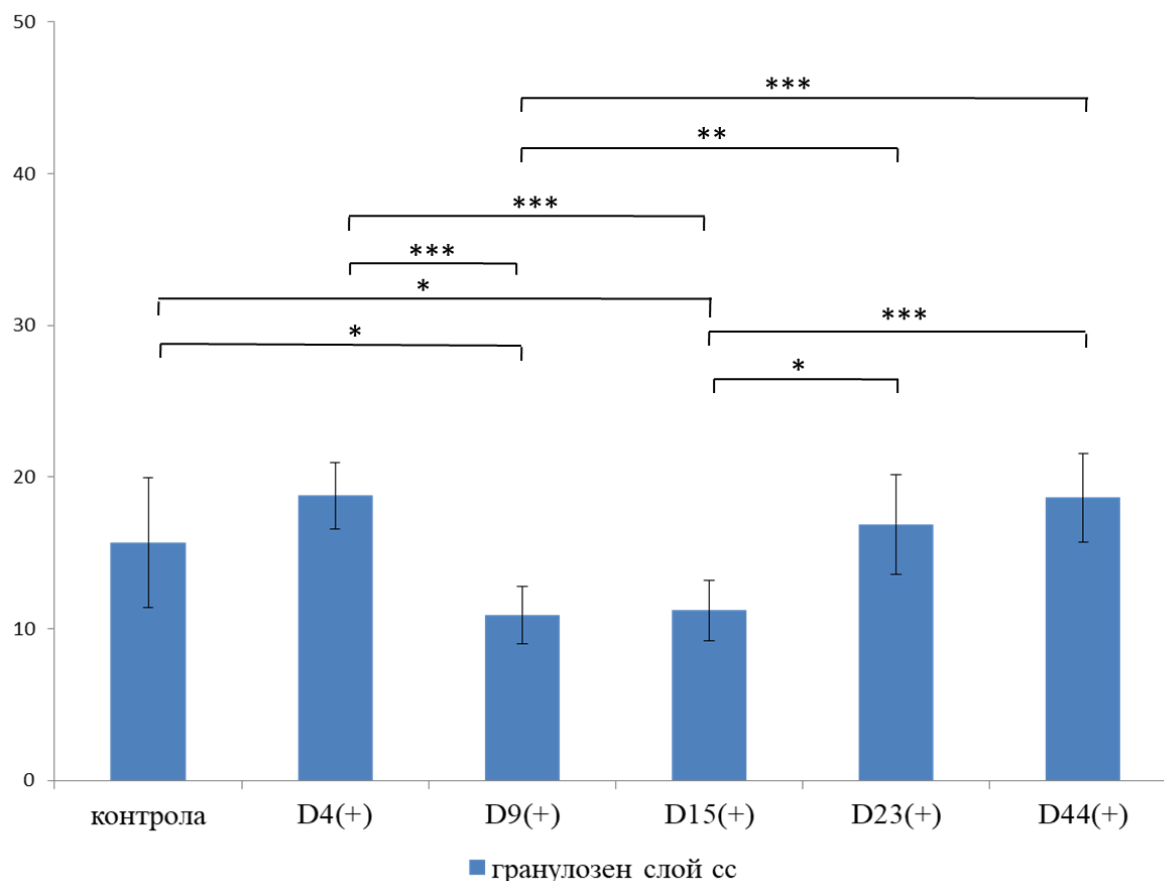
При група D9(+) установихме статистическа разлика спрямо контролната група ($p < 0.05$), D4(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.01$) и D44(+) ($p < 0.001$). Спрямо четирите посочени групи, D9(+) показва най-малък брой новообразувани клетки.

За група D15(+) получихме статистическа достоверност спрямо контролата ($p < 0.05$), D4(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.05$) и D44(+) ($p < 0.001$).

Отново спрямо четирите посочени групи, D15(+) показва най-малък брой новообразувани клетки.

За група D23(+) получихме статистическа достоверност спрямо D9(+) ($p < 0.01$) и към D15(+) ($p < 0.05$). При D23(+) има по-голям брой BrdU(+) клетки от тях.

При група D44(+) се отчете достоверна разлика в новообразуваните клетки на гранулозния слой към D9(+) ($p < 0.001$) и към D15(+) ($p < 0.001$). D44(+) показва по-голям брой BrdU(+) клетки от тях.



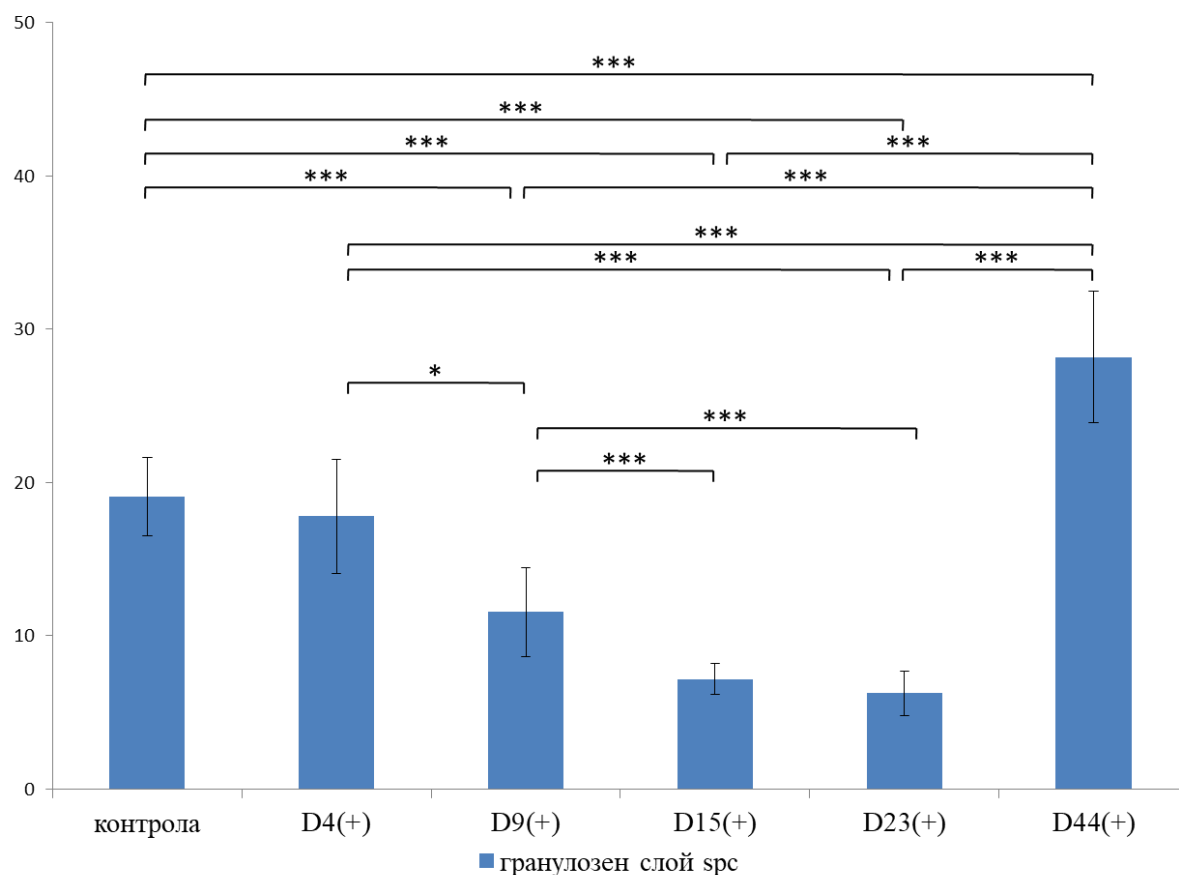
Фиг. 5.16. Брой BrdU(+) клетки в гранулозния слой на сравняваните групи в цереброцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; сс – цереброцеребелум.

Гранулозен слой – спиноцеребелум (Фиг. 5.17). При контролната група при гранулозния слой на спиноцеребелума се намери статистическа значима разлика на броя новообразувани клетки спрямо D9(+) ($p < 0.001$),

D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). Спрямо D9(+), D15(+) и D23(+) се отброяват повече маркирани клетки, а спрямо D44(+) - по-малко.

При група D4(+) се наблюдава достоверна разлика спрямо D9(+) ($p < 0.05$), D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). При D9(+), D15(+) и D23(+) се намериха по-малко BrdU(+) клетки, а при D44(+) - повече.

При група D9(+) намерихме статистическа значима разлика по отношение на контролна група ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.05$), D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). При D15(+) и D23(+) се отброяват по-малко маркирани клетки, а при контролната, D4(+) и D44(+) има повече, отколкото при D9(+).



Фиг. 5.17. Брой BrdU(+) клетки в гранулозния слой на сравняваните групи в спиноцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; спс – спиноцеребелум.

При група D15(+) се установи достоверна разлика в новообразуваните клетки на гранулозен слой в сравнение с контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). Спрямо всички посочени групи броят BrdU(+) клетки беше по-малък при D15(+).

При група D23(+) се намери достоверност в разликата на броя BrdU(+) клетки в сравнение с контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). Спрямо всички посочени групи броят BrdU(+) клетки беше достоверно по-малък при D15(+).

При група D44(+) се изброиха значително голям брой новообразувани клетки. Статистически значима разлика се откри при сравнение с контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.001$), D15(+) ($p < 0.001$) и D23(+) ($p < 0.001$). Спрямо всички изброени групи броят BrdU(+) клетки на D44(+) беше по-голям.

Бяло вещество – цереброцеребелум (Фиг. 5.18). При контролната група на бялото вещество се намери статистически значима разлика при сравнение с D4(+) ($p < 0.01$) и с D9(+) ($p < 0.01$). Спрямо тези групи броят BrdU(+) клетки при контролната група беше по-малък.

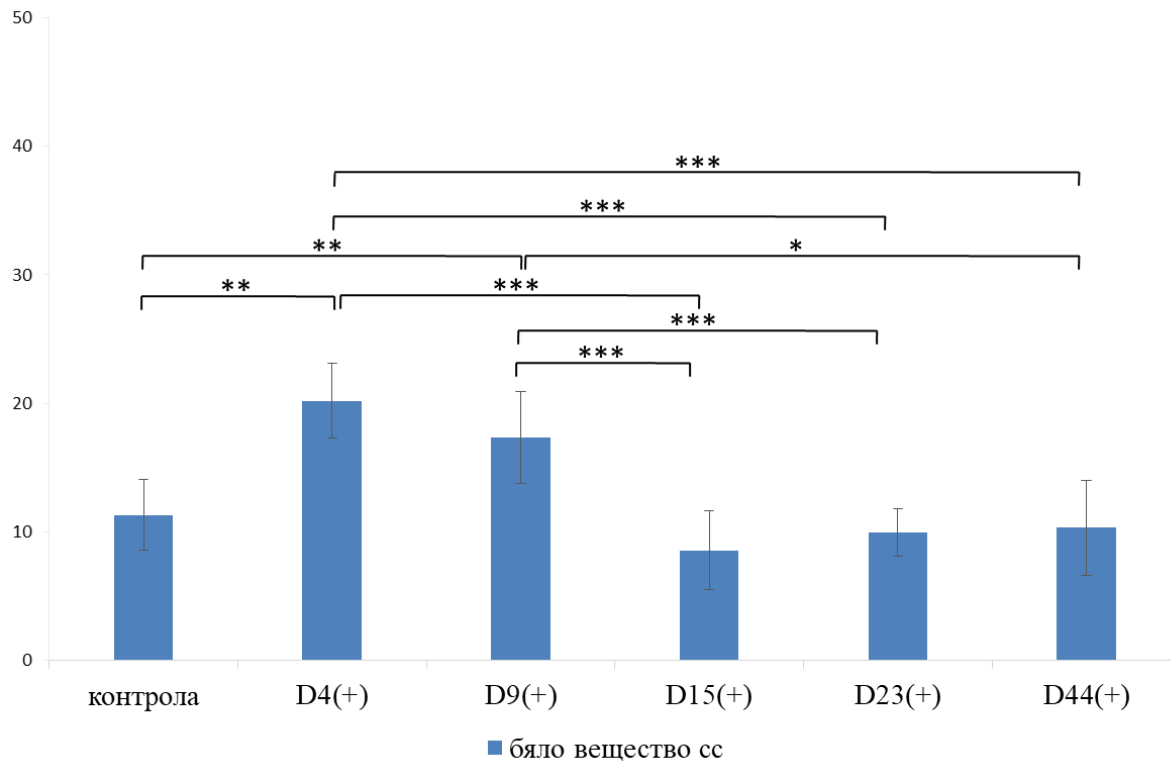
При група D4(+) установихме достоверна разлика в броя BrdU(+) клетки спрямо контролата ($p < 0.01$), D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.001$). Контролата, D15(+), D23(+) и D44(+) показаха по-малък брой новообразувани клетки от D4(+).

При група D9(+) намерихме статистически значима разлика при сравнение с контролната група ($p < 0.01$), с D15(+) ($p < 0.001$), с D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.05$). D9(+) се оказа с най-голям брой изброени клетки при сравнението с тези групи. Липсваше разлика с D4(+).

При група D15(+) се оказа достоверна разликата в броя BrdU(+) клетки само спрямо D4(+) ($p < 0.001$) и D9(+) ($p < 0.001$). Спрямо изброените групи броят BrdU(+) клетки беше най-малък за D15(+).

При групата D23(+) установихме разлика със статистическа достоверност само спрямо D4(+) ($p < 0.001$) и D9(+) ($p < 0.001$). Спрямо изброените групи броят BrdU+ клетки беше най-малък за D23(+).

При групата D44(+) намерихме достоверна разлика в броя BrdU+ клетки само спрямо D4(+) ($p < 0.001$) и D9(+) ($p < 0.05$). D44(+) се оказа с най-малък брой изброени клетки при сравнението.

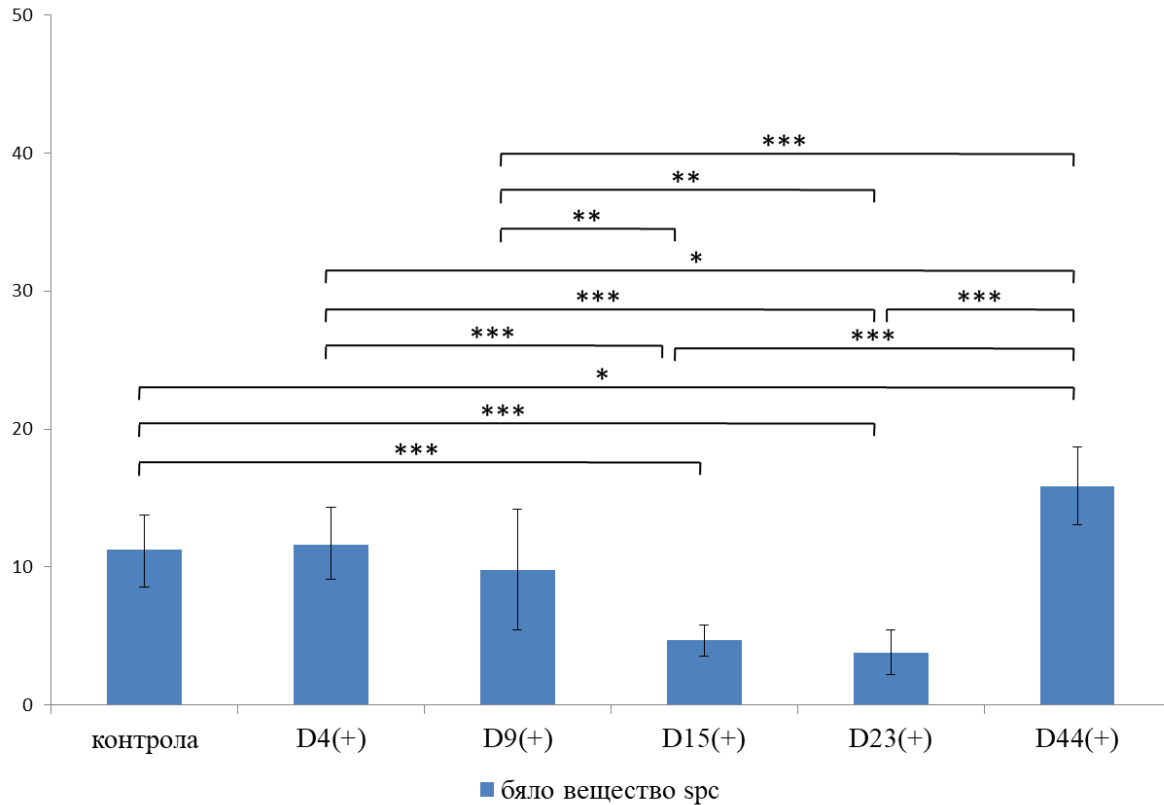


Фиг. 5.18. Брой BrdU(+) клетки в бялото вещество на сравняваните групи в цереброцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; cc – цереброцеребелум.

Бяло вещество – спиноцеребелум (Фиг. 5.19). За бялото вещество на спиноцеребелума при контролната група не установихме статистически значима разлика при сравнение с D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.05$). Контролната група се оказва с по-голям брой BrdU(+) клетки спрямо D15(+) и D23(+) и с по-малко от D44(+).

При група D4(+) намерихме достоверна разлика спрямо D15(+) ($p < 0.001$), D23(+) ($p < 0.001$) и D44(+) ($p < 0.05$). D4(+) се оказва с по-голям брой BrdU(+) клетки спрямо D15(+) и D23(+) ($p < 0.001$) и с по-малко от D44(+) ($p < 0.05$).

При група D9(+) резултатите показаха статистически значима разлика спрямо D15(+) ($p < 0.01$), D23(+) ($p < 0.01$) и D44(+) ($p < 0.001$). D9(+) се оказва с по-голям брой BrdU(+) клетки спрямо D15(+) и D23(+) ($p < 0.01$) и с по-малко от D44(+) ($p < 0.001$).



Фиг. 5.19. Брой BrdU(+) клетки в бялото вещество на сравняваните групи в спиноцеребелума на малкия мозък; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; spc – спиноцеребелум.

Група D15(+) показва достоверна разлика спрямо контролната ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.01$) и D44(+) ($p < 0.001$). D15(+) се оказва с най-малък брой BrdU(+) клетки при сравнението, спрямо горните групи и с повече спрямо D23(+), но без статистическа значимост спрямо последната.

При група D23(+) анализът показва статистически значима разлика спрямо контролата ($p < 0.001$), D4(+) ($p < 0.001$), D9(+) ($p < 0.01$) и D44(+) ($p < 0.001$). D23(+) се оказва с най-малък брой BrdU(+) клетки от изброените групи.

При група D44(+) намерихме достоверна разлика в броя BrdU(+) клетки спрямо контролната група ($p < 0.05$), D4(+) ($p < 0.05$), D9(+) ($p < 0.001$), D15(+) ($p < 0.001$) и D23(+) ($p < 0.001$). D44(+) се оказва с най-голям брой изброени клетки при сравнението, спрямо всички останали групи.

5.2.2. Сравнение на броя на новообразуваните клетки при едноименните слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума на контролната и исхемичните групи

При обработката на данните за клетъчната пролиферация в малкия мозък на контролната и исхемичните проби направи впечатление разликата в броя на BrdU(+) клетки между пробите от цереброцеребелума и спиноцеребелума. Сравнихме пролиферацията между отделните слоеве – молекуларен, гранулозен и бяло вещество и получихме по-долу изложените данни.

При **контролната група** животни не се намери статистически значима разлика в броя BrdU(+) клетки между цереброцеребелума и спиноцеребелума (Фиг. 5.20).

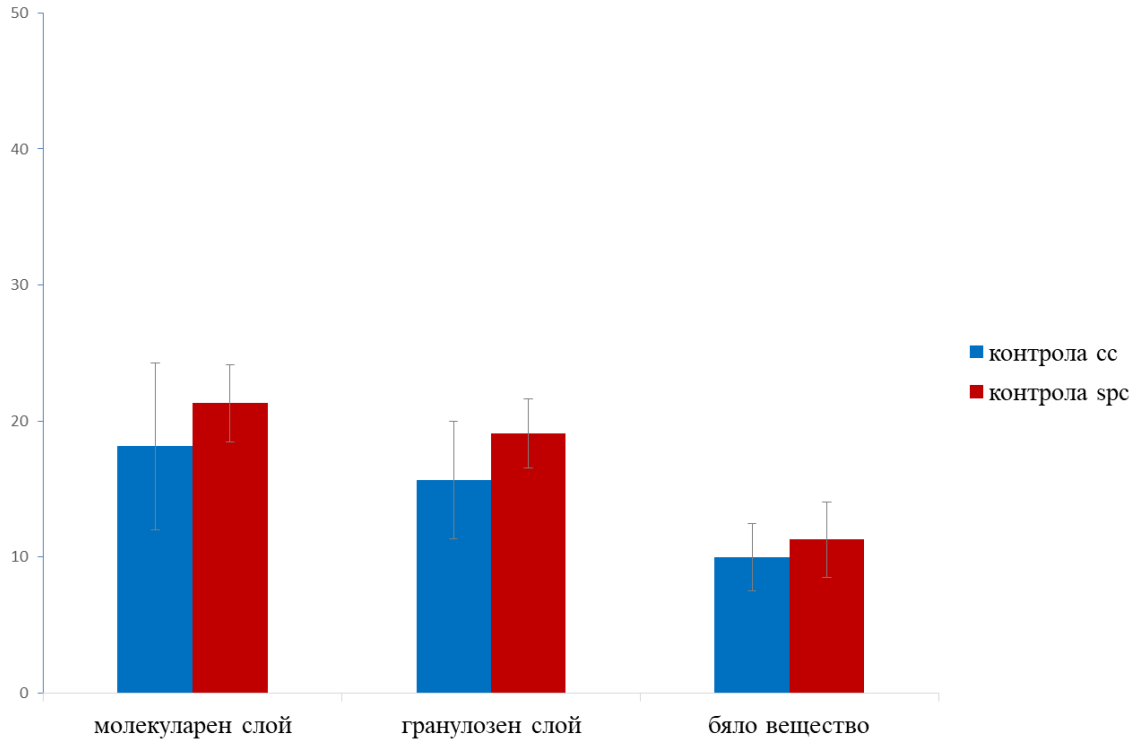
При животните от група **D4(+)** се оказа значима разликата в темпа на клетъчно делене само в бялото вещество, като при цереброцеребелума установихме по-голям брой BrdU-имунопозитивни клетки ($p < 0.001$) (Фиг. 5.21).

За животните от група **D9(+)** получихме достоверна разлика в нивата на пролиферация при молекуларения слой ($p < 0.001$) и бялото вещество ($p < 0.01$). Отново по-голям е броят на BrdU(+) клетки при цереброцеребелума (Фиг. 5.22).

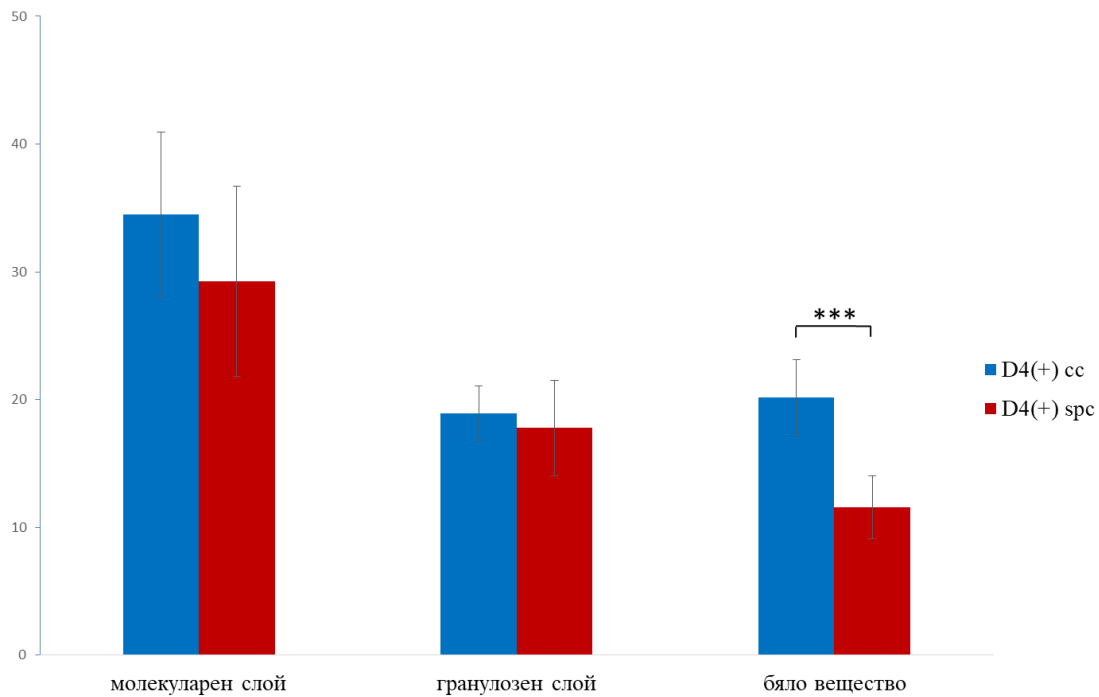
При **D15(+)** установихме статистически достоверна разлика в пролиферацията и на трите области – молекуларен ($p < 0.001$), гранулозен слой ($p < 0.001$) и бяло вещество ($p < 0.01$), с по-малко количество клетки в спиноцеребелума (Фиг. 5.23).

При **D23(+)** се оказа също, че има достоверна разлика с по-голям брой BrdU(+) клетки в молекуларния ($p < 0.001$), гранулозни слой ($p < 0.001$) и бялото вещество ($p < 0.001$) на пробите от цереброцеребелума (Фиг. 5.24).

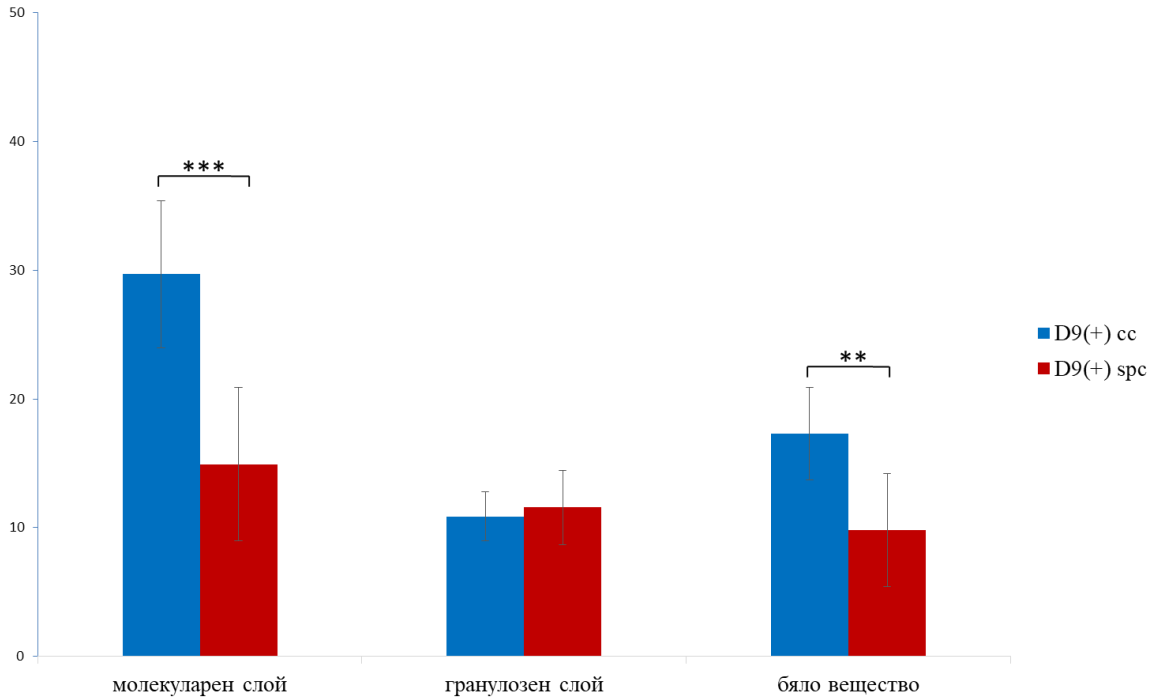
В групата с най-дълга преживяемост **D44(+)** броят на BrdU(+) клетките се оказа сравнимо по-голям в спиноцеребеларните проби на опитните животни. Достоверна разлика се откри при гранулозния слой ($p < 0.01$) и бялото вещество ($p < 0.05$) (Фиг. 5.25).



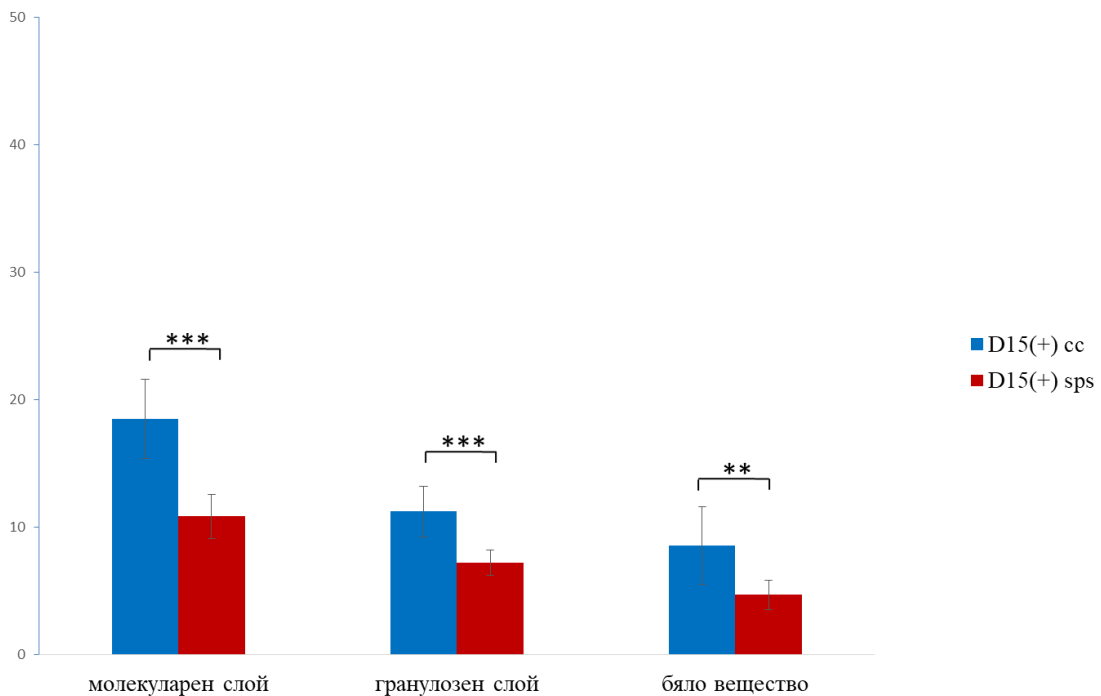
Фиг. 5.20. Сравнение на броя *BrdU*(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при контролната група; *cc* – цереброцеребелум; *spc* – спиноцеребелум.



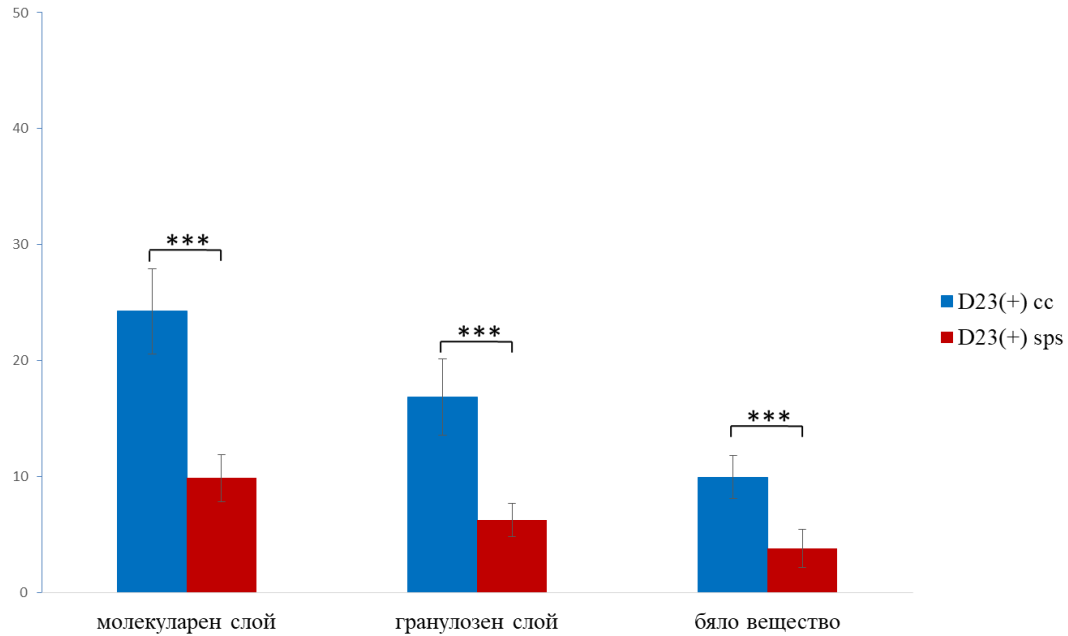
Фиг. 5.21. Сравнение на броя *BrdU*(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при група *D4*(+); *** $p < 0.001$; *cc* – цереброцеребелум; *spc* – спиноцеребелум.



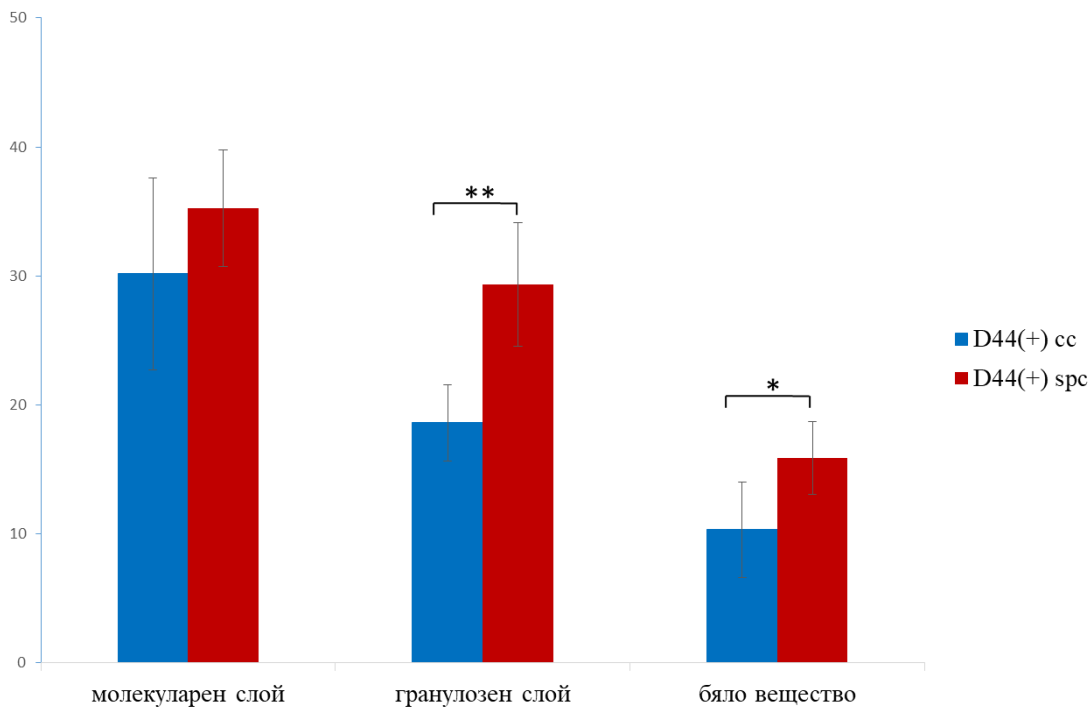
Фиг. 5.22. Сравнение на броя BrdU(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при D9(+); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; cc – цереброцеребелум; spc – спиноцеребелум.



Фиг. 5.23. Сравнение на броя BrdU(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при група D15(+); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; cc – цереброцеребелум; spc – спиноцеребелум.



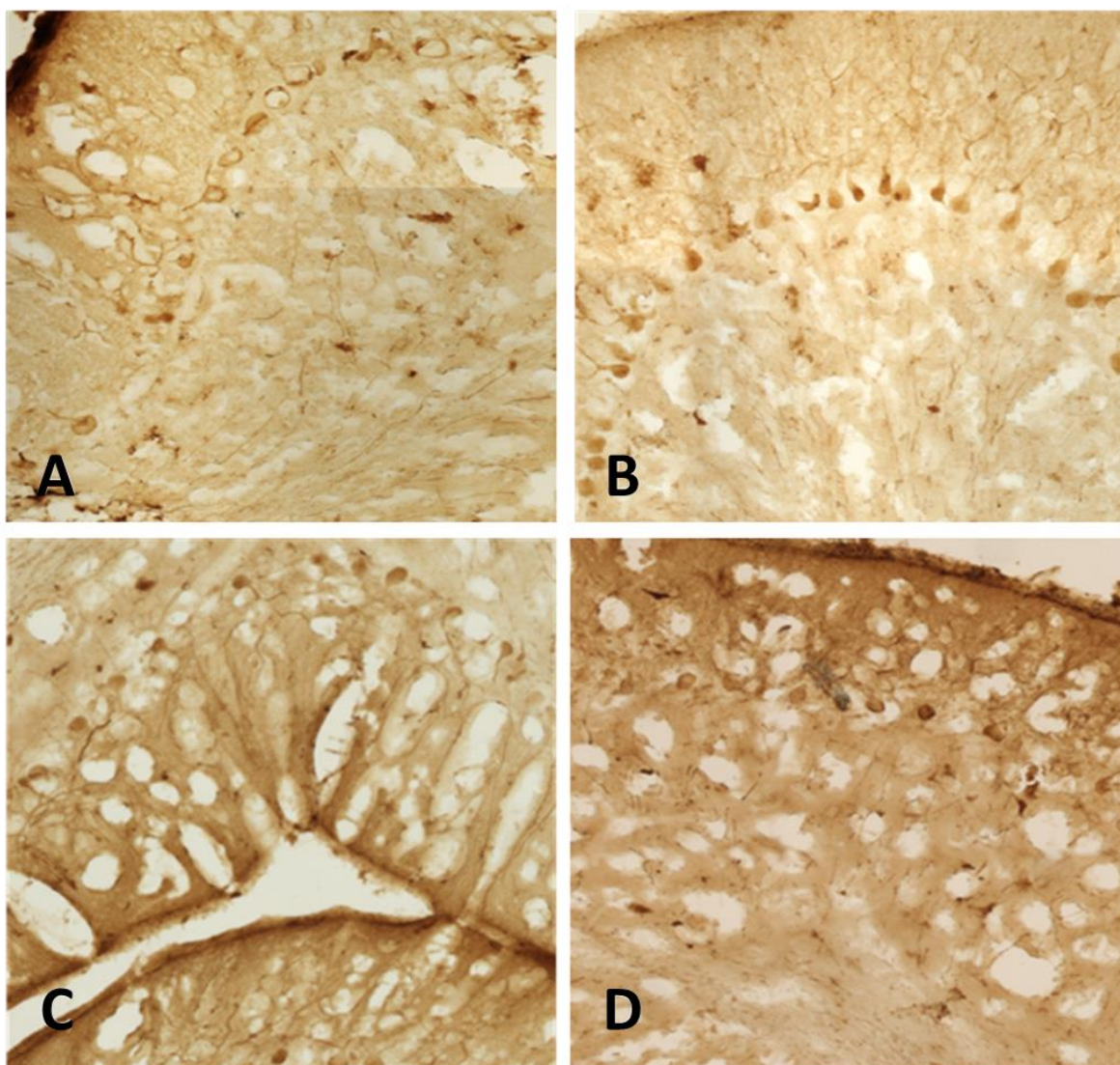
Фиг. 5.24. Сравнение на броя BrdU(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при група D23(+); *** $p < 0.001$; cc – цереброцеребелум; sps – спиноцеребелум.



Фиг. 5.25. Сравнение на броя BrdU(+) клетки между едноименни слоеве в малкия мозък между цереброцеребелума и спиноцеребелума при група D44(+); ** $p < 0.05$; * $p < 0.01$; cc – цереброцеребелум; spc – спиноцеребелум.

5.3. Сравнение на количеството на Calbindin(+) клетки в малкомозъчната кора между отделните изследвани групи

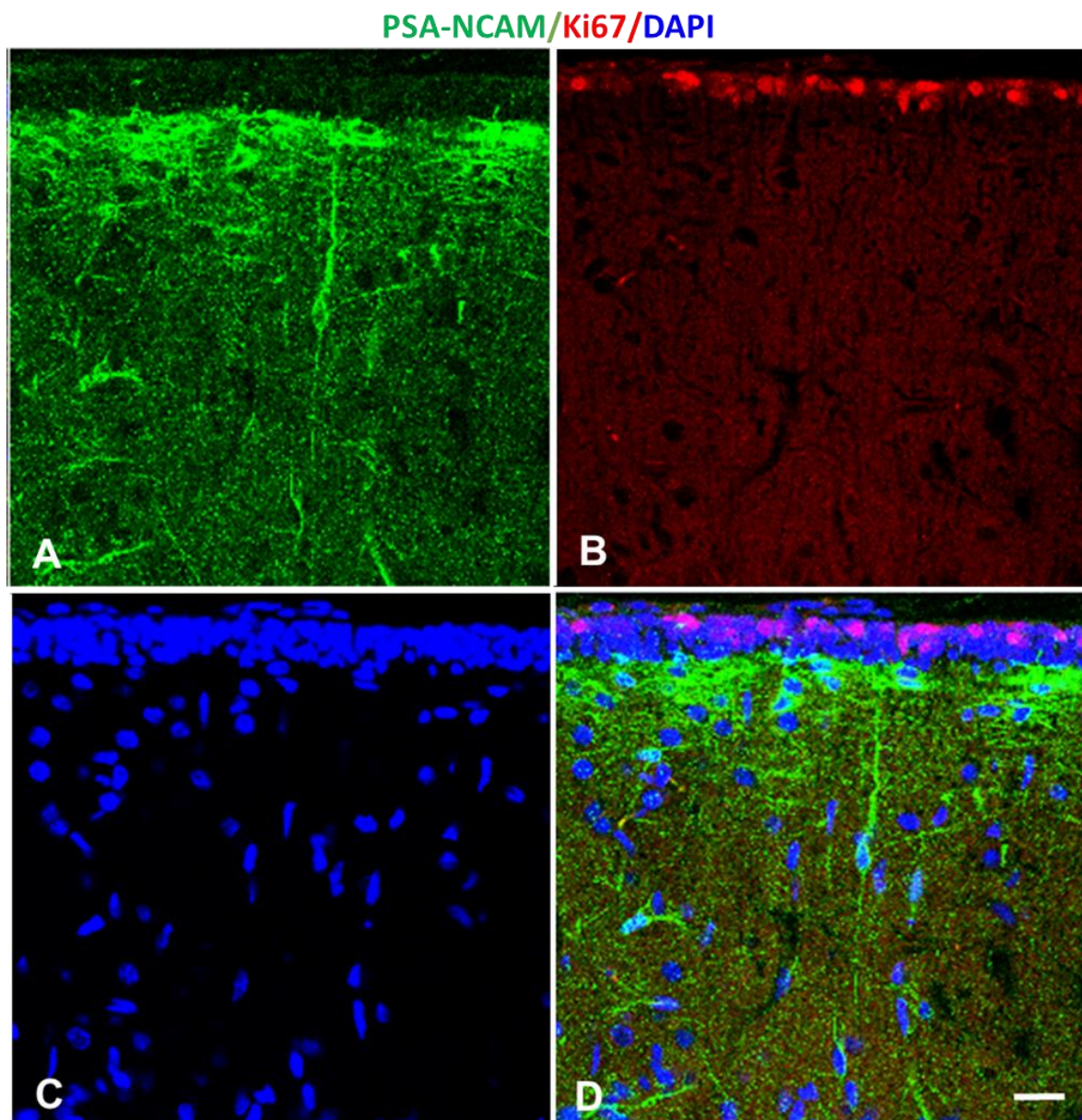
Сравнихме количеството на Calbindin(+) клетки, които в същност са клетки на Пуркиние в ганглийния слой на малкомозъчната кора, при възрастни в състояние на исхемия животни от групи D4(+), D9(+), D15(+), D23(+) и D44(+). Установихме намаление на броя на клетките на Пуркиние във всички групи, което е неравномерно и в различна степен в отделните части на малкия мозък (Фиг. 5.26).



Фиг. 5.26. Намаление в количеството на Calbindin(+) клетки (клетки на Пуркиние) в малкомозъчната кора при възрастни животни с исхемия A-D9(+); B-D15(+); C-D23(+) и D-D44(+). Имунохистохимично пероксидазно оцветяване с DAB субстрат; оригинално увеличение 10.

5.4. Фенотип на новообразуваните клетки в малкия мозък във възрастов аспект

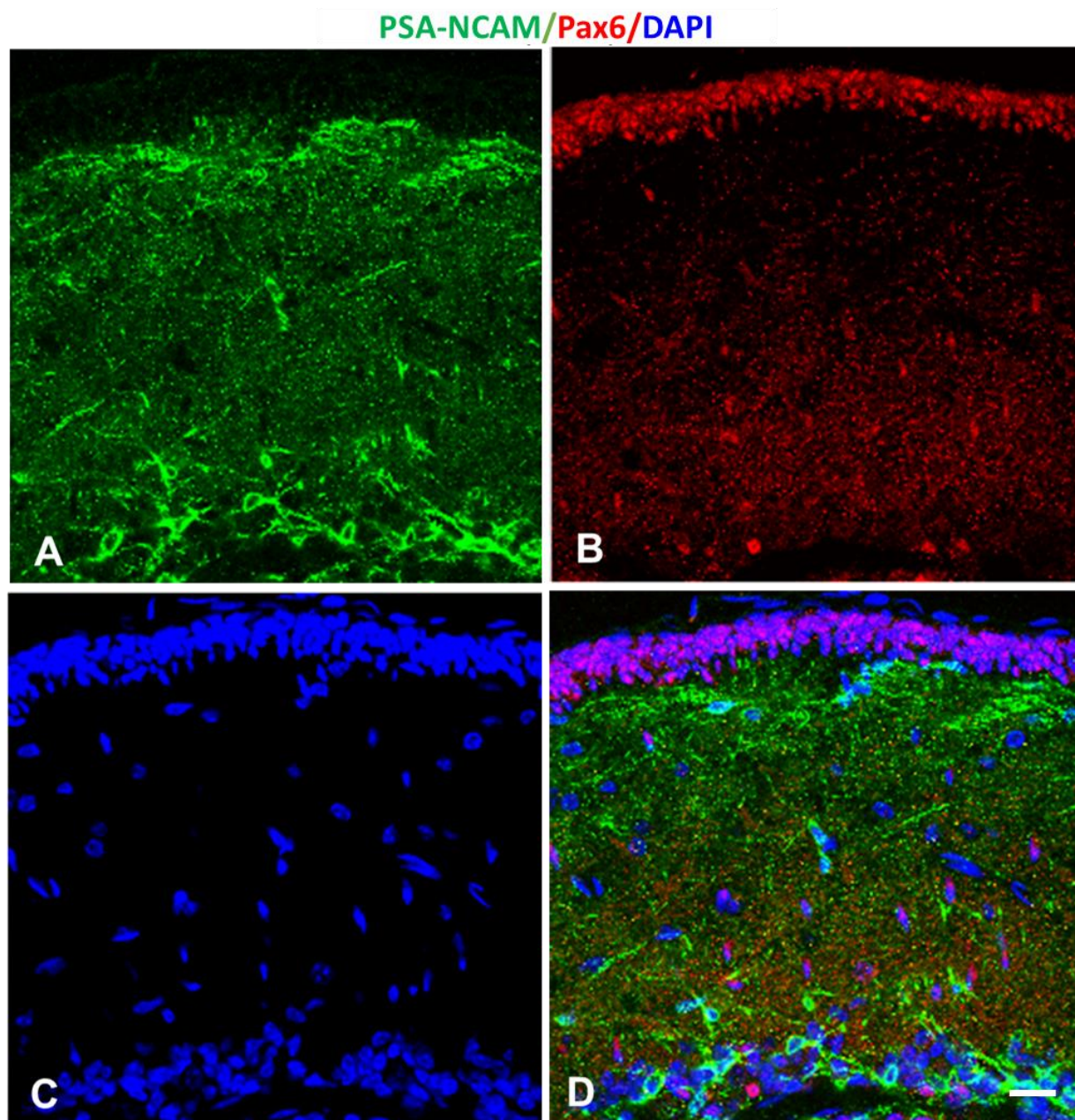
При анализ на имунофлуоресцентните оцветявания на пробите от малък мозък на новородени животни, маркирани с комбинация от PSA-NCAM(polysialylated neuronal cell adhesion molecule)/Ki67/DAPI наблюдавахме многобройни ядра, изтъкнати с DAPI, както и висока честота на Ki67(+) клетки в EGL (външен гранулозен слой). Не се намери колокализация на маркера за пролиферация Ki67 и този за развиващи се и мигриращи неврони PSA-NCAM (Фиг. 5.27).



Фиг. 5.27. Тройно PSA-NCAM/Ki67/DAPI имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък

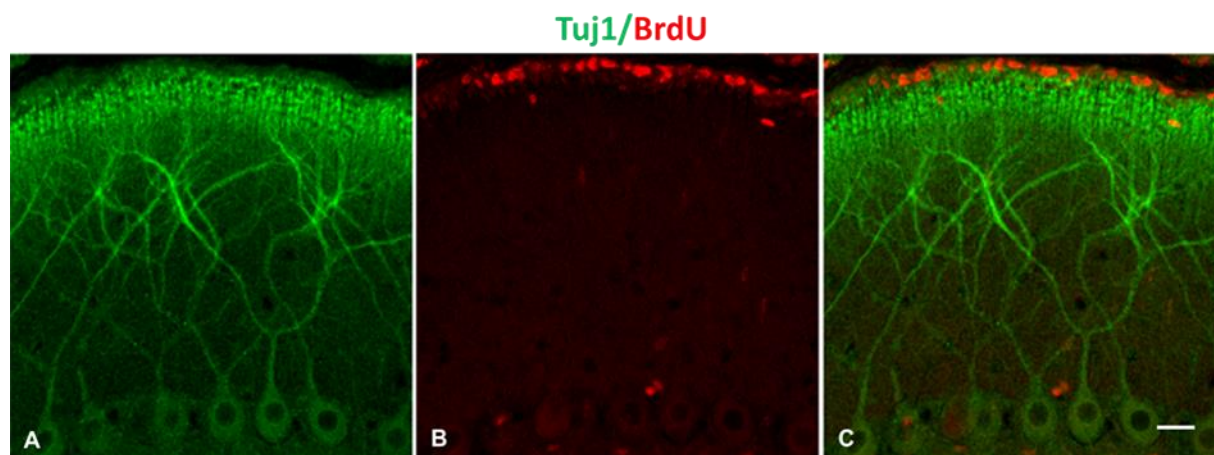
мозък на новородена маймуна; *bar*, 20 μ m.

Разгледаните комбинирани оцветявания на клетъчния маркер PSA-NCAM с транскрипционния маркер за неврални прогенитори Pax6 при новородени индивиди не показват колокализация (Фиг. 5.28).



Фиг. 5.28. Тройно PSA-NCAM/Pax6/DAPI имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на новородена маймуна; *bar*, 20 μ m.

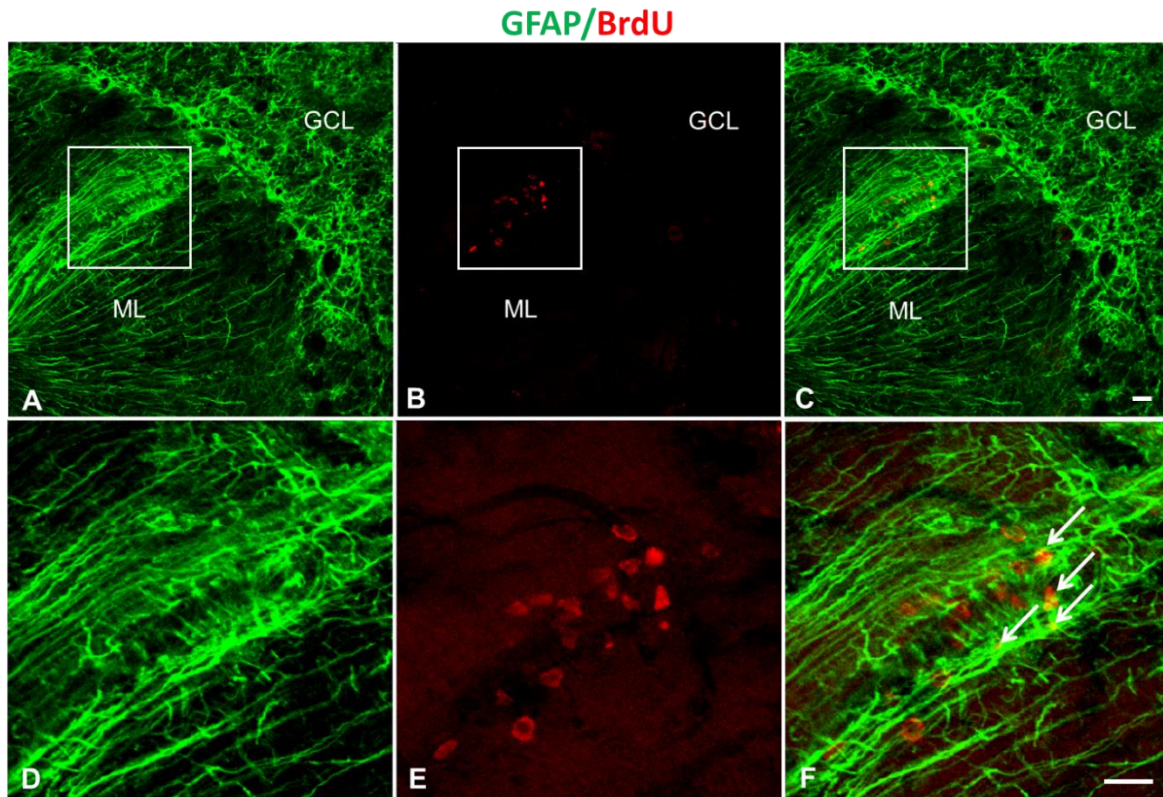
При едногодишните проби липсва колокализация на маркера за клетъчно делене BrdU и невронално специфичния маркер Tuj1 (β III-tubulin) (Фиг. 5.29).



Фиг. 5.29. Двойно Tuj1/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на едногодишна маймуна; bar, 20 μ m.

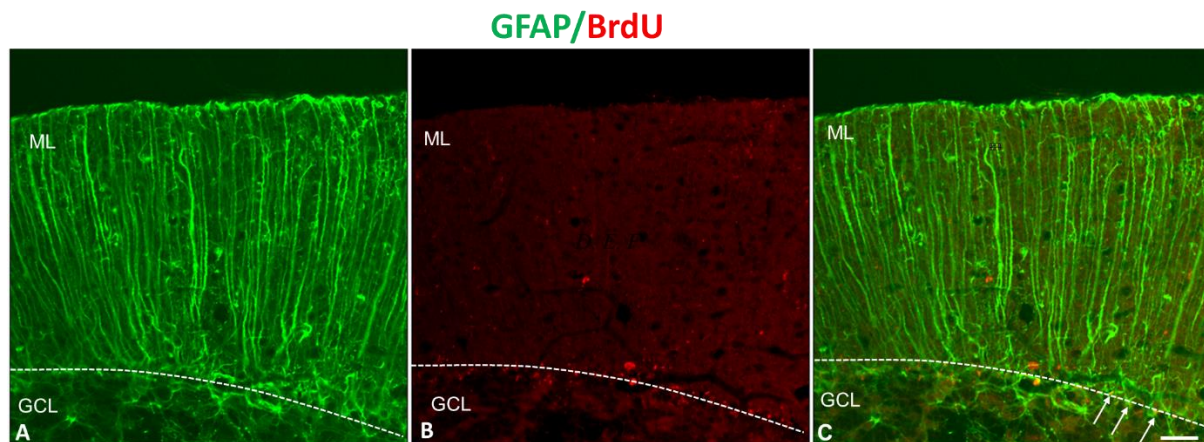
5.5. Фенотип на новообразуваните клетки в малкия мозък след исхемия

В проба от група D9(+) се намери колокализация на пролиферативния маркер BrdU и GFAP (glial fibrillary acidic protein) - маркер за неврогенни прогенитори и астроцити във възрастния мозък (Фиг. 5.30).



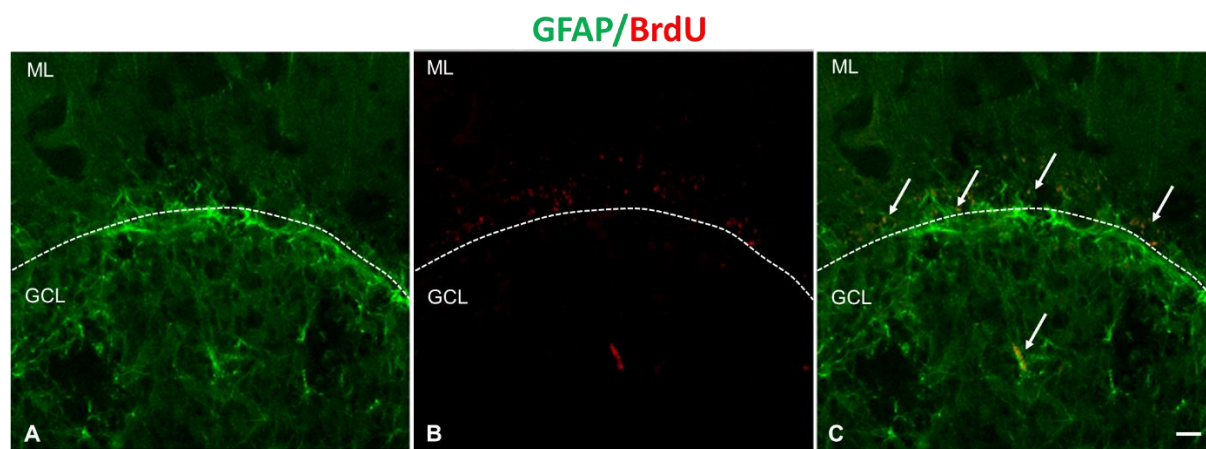
Фиг. 5.30. Двойно GFAP/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на маймуна от група D9(+). Правоъгълните полета в А, В и С отговарят съответно на D, E, F. Със стрелки са посочени GFAP(+)/BrdU(+) клетки; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m: еднакъв за А, В, С и D, E, F.

При група D15(+) има колокализация на BrdU и GFAP в кората на малкия мозък (Фиг. 5.31).



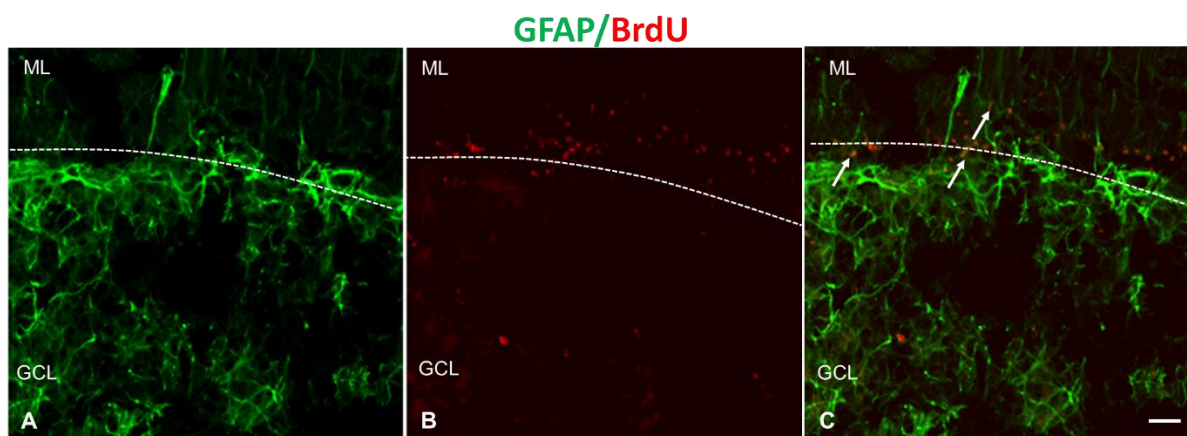
Фиг. 5.31. Двойно GFAP/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на маймуна от група D15(+). Със стрелки са посочени GFAP(+)/BrdU(+) клетки; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

В проба D23(+) също открихме колокализация на BrdU с GFAP (Фиг. 5.32).



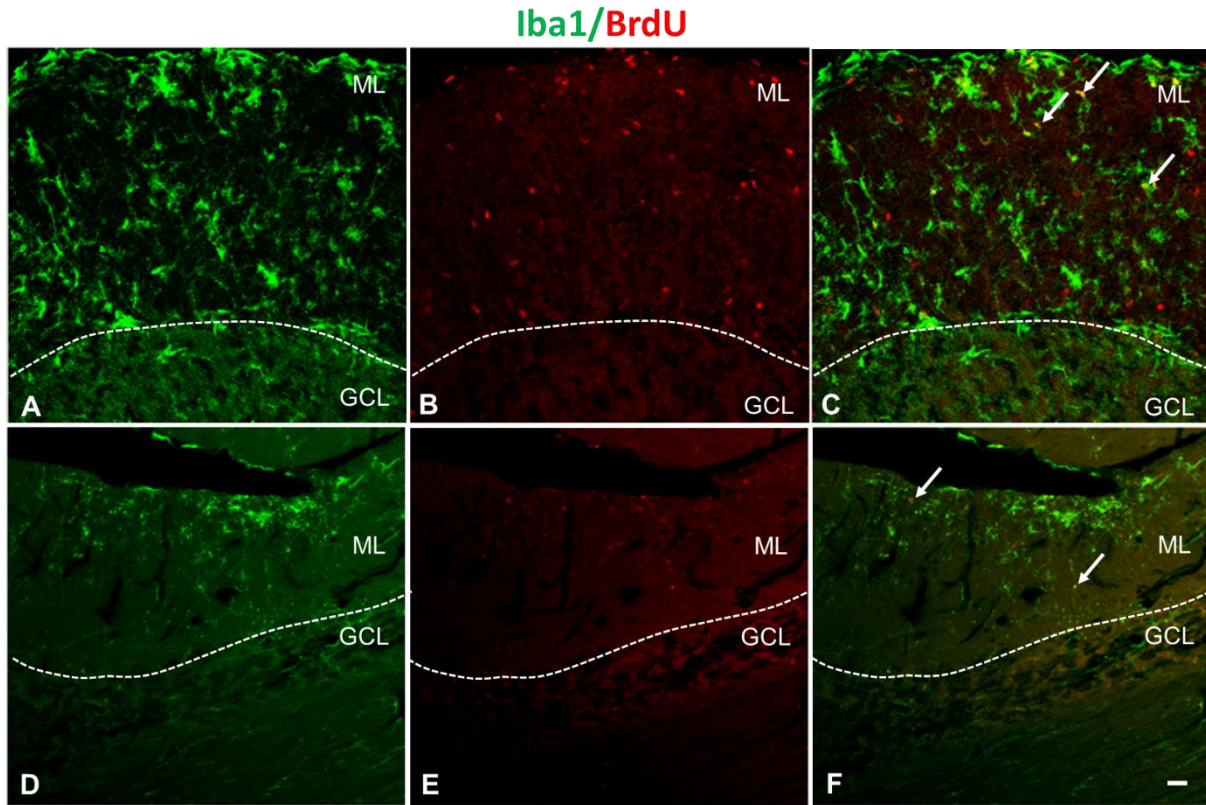
Фиг. 5.32. Двойно GFAP/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на маймуна от група D23(+). Със стрелки са посочени GFAP(+)/BrdU(+) клетки; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

Едновременно наличие на BrdU и GFAP се откри и в D44(+) (Фиг. 5.33).



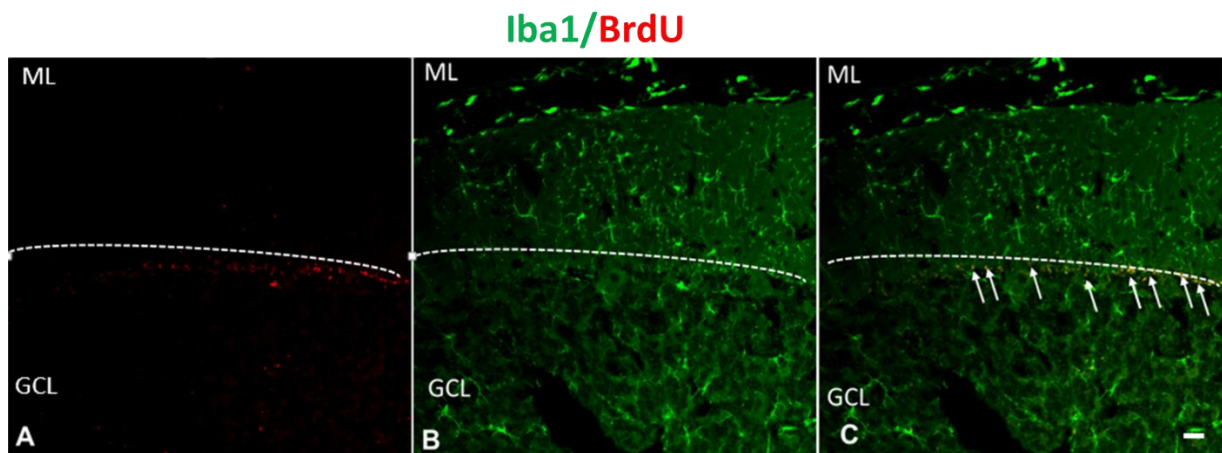
Фиг. 5.33. Двойно GFAP/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване в кората на малък мозък на маймуна от група D44(+). Със стрелки са посочени GFAP(+)/BrdU(+) клетки; bar, 20 μ m.

В групи D4(+) и D15(+) има клетки с наличие на колокализация на BrdU и маркера за активирана глия Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule) със значимо по-малък брой при D15(+) (Фиг. 5.34).



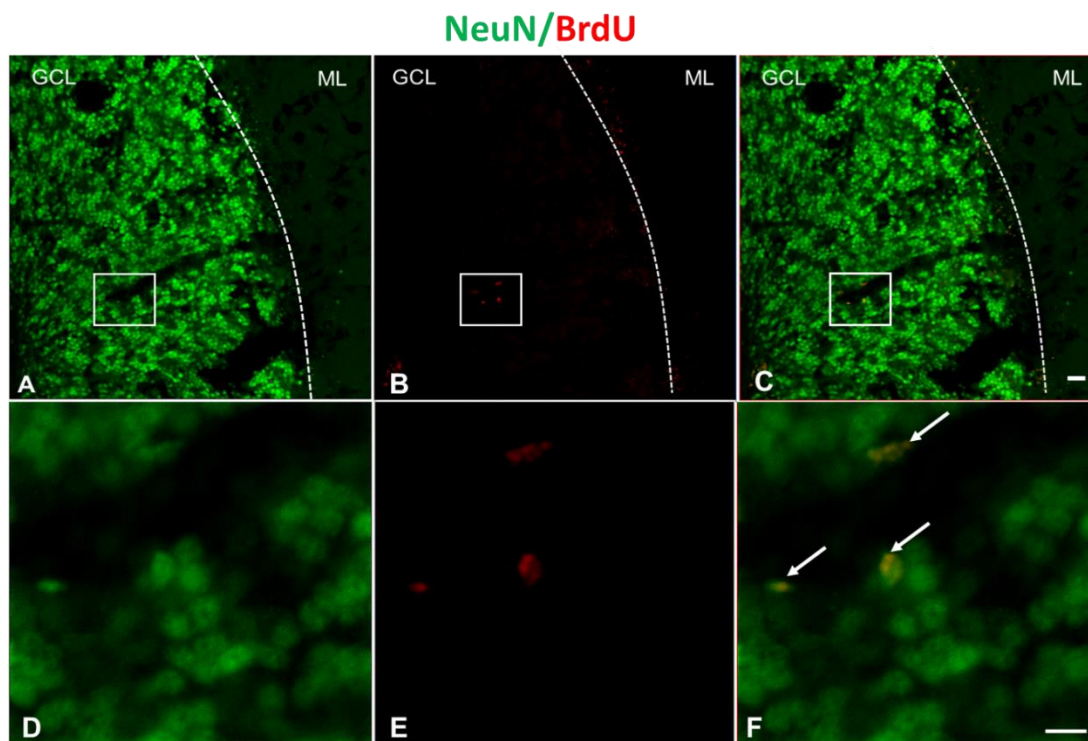
Фиг. 5.34. Двойно Iba1/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на маймуна от група D4(+) - A, B, C и D15(+) - D, E, F. Със стрелки са посочени Iba1(+)/BrdU(+) клетки; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

При група D44(+) се установи голям брой клетки с колокализация на BrdU и Iba1 (Фиг. 5.35).



Фиг. 5.35. Двойно Iba1/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на маймуна от група D44(+). Със стрелки са посочени Iba1(+)/BrdU(+) клетки; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

При анализ на група D23(+) се намериха единични клетки с едновременно наличие на клетъчния маркер за постмитотични зрели неврони – NeuN (neuron-specific nuclear protein) и BrdU (Фиг. 5.36).

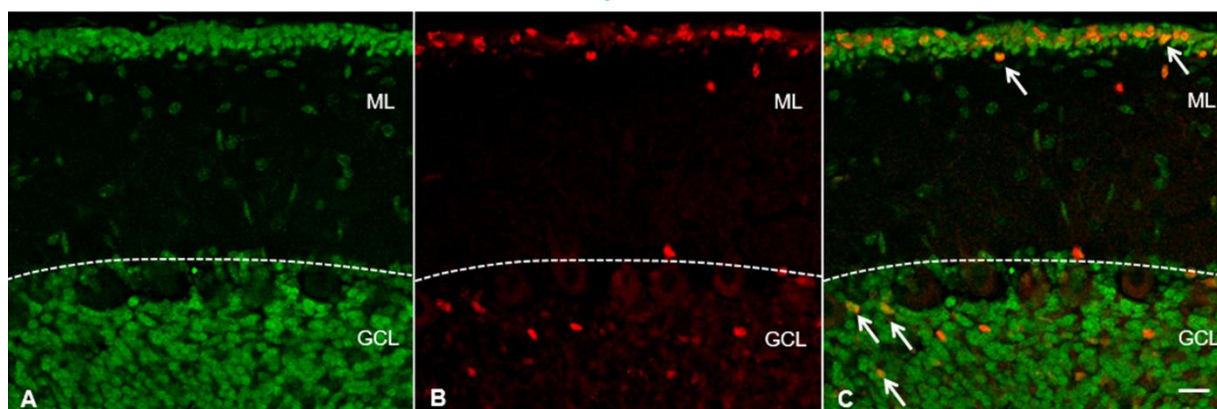


Фиг. 5.36. Двойно NeuN/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на маймуна от група D23(+); Правоъгълните полета в А, В и С отговарят съответно на D, Е, F. GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m: еднакъв за А, В, С и D, Е, F.

5.6. Експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 в малкия мозък във възрастов аспект и след исхемия

При новородените животни транскрипционният фактор Pax6, експресиращ се в развиващи и диференциращи се прогениторни клетки, е представен в голямо количество в EGL и IGL (вътрешен гранулозен слой). Наблюдава се колокализация с пролиферативния маркер BrdU. EGL е добре представен при новородените маймуни. Той е източник на гранулозни прогениторни клетки, които ще оформят окончателния гранулозен слой (Фиг. 5.37).

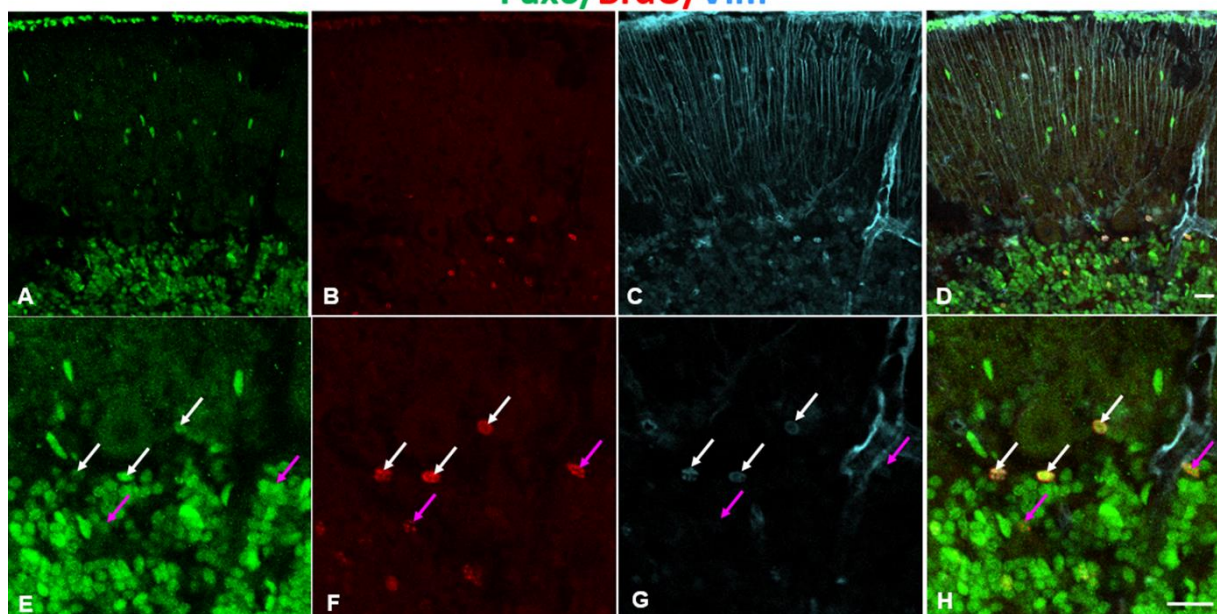
Pax6/BrdU



Фиг. 5.37. Двойно Pax6/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на новородена маймуна; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

При едногодишните животни EGL е редуциран, с прекъсвания на целостта и с по-малък брой Pax6(+) клетки. Наблюдава се колокализация на Pax6(+) с BrdU, както и с виментин при някои от клетките (Фиг. 5.38).

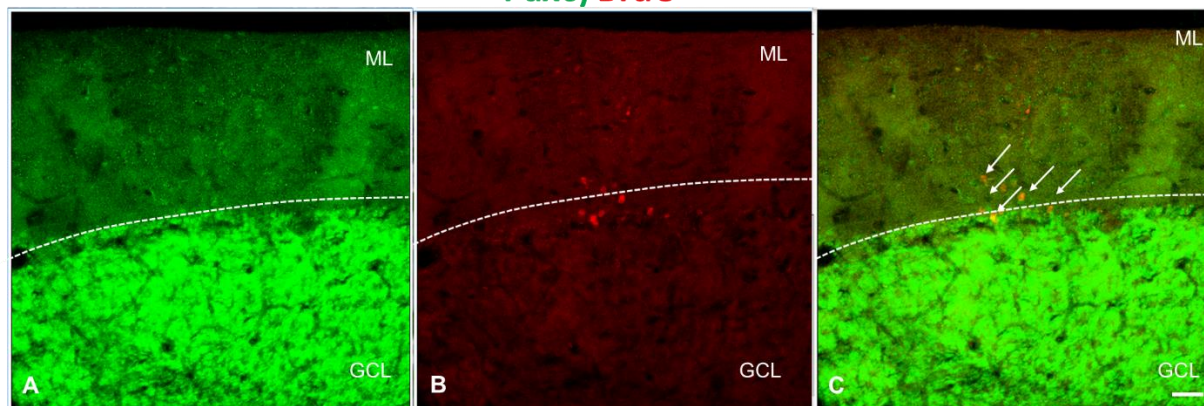
Pax6/BrdU/Vim



Фиг. 5.38. Тройно Pax6/BrdU/Vim имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на едногодишна маймуна; bar, 20 μ m: еднакъв за A, B, C, D и E, F, G, H.

При животни от група D9(+) EGL липсва. Наблюдава се колокализация на Pax6(+) с BrdU в молекуларния и гранулозния слой (Фиг. 5.39).

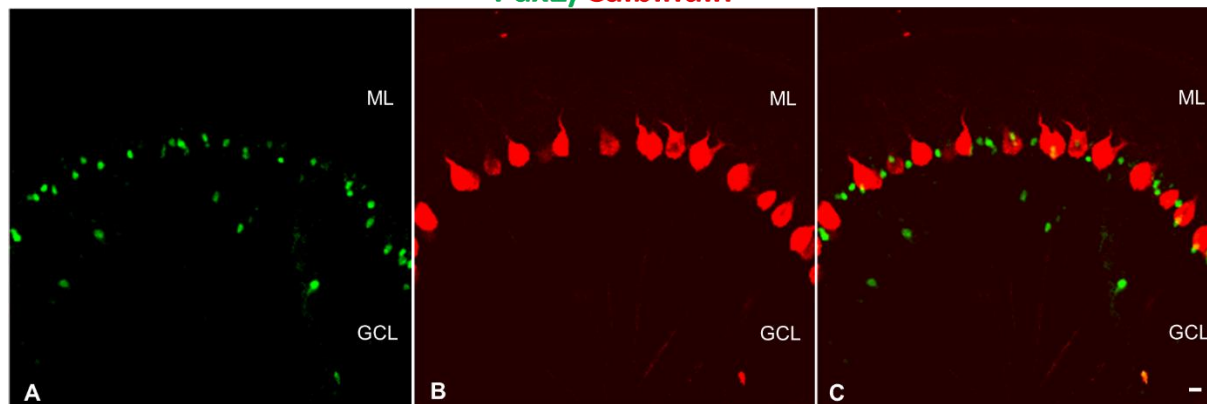
Pax6/BrdU



Фиг. 5.39. Двойно Pax6/BrdU имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на маймуна от група D9(+); GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

Pax2(+) клетки при новородените се наблюдават между клетките на Пуркиние, маркирани с Calbindin и в гранулозния слой (Фиг. 5.40).

Pax2/Calbindin



Фиг. 5.40. Двойно Pax2/Calbindin имунофлуоресцентно оцветяване на малък мозък на новородена маймуна; GCL-гранулозен слой; ML-молекуларен слой; bar, 20 μ m.

6. Обсъждане

Настоящото изследване представя детайлни експериментални данни за количеството на пролифериращите клетки в малкия мозък на възрастни японски маймуни (*Macaca fuscata*) при увреда, причинена от глобална мозъчна исхемия. Направихме фенотипен анализ на *de novo* образуваните клетки и анализ на експресията на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 в кората на малкия мозък във възрастов аспект - при новородени, ювенилни и възрастни примати, а при възрастните и след глобална мозъчна исхемия.

6.1. Количество, разпределение и динамика на новообразуваните клетки в малкия мозък

Инкорпорирането на тимидиновия аналог BrdU в отделните възрастови групи логично беше по-силно изразено при по-младите животни. При новородените количеството на BrdU(+) клетки превишаваше значително тези при едногодишните, а от своя страна при тях също имаше значително повече пролифериращи клетки, отколкото при възрастните животни от контролната група. Тази тенденция определено показва влиянието на увеличаването на възрастта като фактор за намаляване степента на пролиферацията в малкия мозък. При новородените животни наблюдавахме добре изразен външен гранулозен слой, където установихме най-интензивната пролиферация. Считаме, че през този период голяма част от пролифериращите клетки са гранулозни прогениторни клетки, които напускат този слой, диференцират се и се установяват във вътрешния гранулозен слой като гранулозни неврони. Тези резултати съответстват на данните на други изследователи, според които новообразуваните клетки от този слой са основно млади постмитотични неврони, мигриращи във вътрешния гранулозен слой (Abrahám et al., 2001; Sato et al., 2008). С нарастване на възрастта външният гранулозен слой постепенно изчезва, а остава само дефинитивният гранулозен слой на мястото на вътрешния гранулозен слой. Тези наши наблюдения са подкрепени от данните за развитие на кората на малкия мозък при мишка и човек (Abrahám et al., 2001; Espinosa and Luo, 2008; Galas et al., 2017).

6.2. Влияние на исхемията върху пролиферацията в малкия мозък

Животните, чиито тъкани анализирахме, бяха евтаназирани на различни периоди след исхемия. На базата на патологичните промени и времето след исхемичния инцидент, увредата се класифицира в три клинични фази: остра, подостра и хронична. Времетраенето и тежестта на всяка варира индивидуално. Това зависи от локализацията на лезията, степента на артериална оклузия и времетраенето ѝ, наличието на колатерална мрежа, метаболитния статус на мозъчната тъкан, възрастта и наличието на съпътстващи заболявания на индивида. Животните, чиито тъкани анализирахме, бяха евтаназирани на различни периоди след исхемията: 4 дни – остра фаза, 9, 15 и 23 дни – подостра фаза и 44 дни – начало на хроничната фаза. Продължителността на проведената глобална исхемия бе 20 минути, което според Zola-Morgan et al. при приматен мозък води до изразени анатомични и поведенчески изменения (Zola-Morgan et al., 1992).

BrdU бе основният маркер за проследяване на делящите се клетки и техните производни. При експерименти с примати, Тончев и сътрудници изследват възможността BrdU да бъде вграден в ДНК на непролифериращи клетки в резултат на ДНК репаративни процеси. Техните данни показват, че BrdU в доза до 500 mg/kg, последвана от оцветяване за BrdU, използвана и в текущия имунохистохимичен протокол не е достатъчна за инкорпорация и/или улавяне на BrdU сигнал в клетки, подложени на ДНК възстановяване (Tonchev et al., 2007). Следователно приемаме, че BrdU(+) клетки в нашето изследване са новообразувани.

De novo генерирани клетки установихме и при възрастните контролни животни от D4(-) група, непреживели глобална мозъчна исхемия. Деленето на клетките в молекуларния и гранулозния слой на кората на малкия мозък при цереб्रोцеребеларните и спиноцеребеларните проби е значимо спрямо бялото вещество. Следователно, дори и при липса на увреда, пролиферацията на клетките в малкия мозък на примати продължава и при израстнали индивиди. Това е отражение на нормалните физиологични процеси на клетъчна смърт и обновяване.

Глобалната мозъчна исхемия, приложена посредством хирургическо лигиране на съдовете, кръвоснабдяващи главния мозък, се използва в научната практика като най-близък модел на сърдечен арест и дава възможност за изучаване на процесите на клетъчна смърт и пролиферация в мозъчната тъкан след такива инциденти. Тя се характеризира с отложеност на

клетъчната смърт, която започва към 3 ден след исхемията и завършва до 5 постисхемичен ден, най-късно до 7 ден и се означава често като “забавена невронална смърт” (Lipton, 1999; Yamashima, 2000). Прогениторната пролиферация в определени, ограничени области на ЦНС (централна нервна система) при примати започва от 3-4 постисхемичен ден, с връх около 7-10 ден и спада до контролното ниво около 3-5 седмица след увреждането (Yagita et al., 2001; Tonchev et al., 2003).

В настоящото проучване установихме, че освен възрастта, исхемията при възрастните животни се оказва важен фактор, който променя клетъчната пролиферация в малкия мозък. От една страна наблюдавахме значително статистически значимо увеличение на *de novo* образуваните клетки при определени исхемични групи спрямо контролата, а в други групи имаше намаление. Проследихме темповете на клетъчно делене по области – молекуларен, гранулозен слой и бяло вещество при животните от различните времеви проби след исхемията. Като цяло се установява поддържане на разликата в броя на BrdU(+) клетките между молекуларния, гранулозния слой и бялото вещество. Във всички проби молекуларният слой показва по-голям брой новообразувани клетки. Гранулозният слой показва статистически значим по-малък ръст на пролиферация от молекуларния (без пробите от D9(+) в спиноцеребелума) и по-голям от този на бялото вещество (с изключение на D4(+) и D9(+)) постисхемични групи в цереброцеребелума). Това най-вероятно се дължи на стимулиращото пролиферативно въздействие на исхемията поради специфичните клетъчно-тъканни елементи в този слой. Молекуларният слой на малкия мозък е най-повърхностен и представлява област с ниска невронално-клетъчна плътност и с висока синаптична честота. Големият брой синапси изисква и съответен брой глиални клетки, осъществяващи контрол върху синаптогенезата, отстранявайки дефектните синаптични връзки и мониториращи синаптичната трансмисия чрез активна постисхемична пролиферация (Gomez-Nicola and Perry, 2015; Bilbo and Stevens, 2017).

При повечето от изследваните слоеве в преобладаващата част от исхемичните групи се очертаха две достоверни тенденции по отношение на динамиката на *de novo* образуваните клетки в малкия мозък. Първата беше рязкото повишение на броя на BrdU(+) клетки при краткосрочните групи D4(+) и D9(+), с последващо постепенно намаляване при групи D15(+) и

D23(+), а втората тенденция беше значителното увеличение на пролифериращите клетки при дългосрочната група D44(+). Установеният по-голям брой BrdU(+) клетки между идентичните слоеве при някои групи с исхемия (в молекулярния слой при D4(+), D9(+), D44(+)) на цереброцеребелума, същия слой при D44(+)) на спиноцеребелума, гранулозния слой при D44(+)) на спиноцеребелума, в бялото вещество на D4(+)) и D9(+)) на цереброцеребелума и при D44(+)) в спиноцеребелума) към съответните контроли показва стимулиращото влияние на исхемията по отношение на клетъчното делене. Тази тенденция е сходна на друго изследване на церебелума при примати (Yeung and Moulaert, 2015). Нашите резултати сочат, че исхемията се явява важен стимулиращ пролиферацията фактор в малкия мозък предимно при краткосрочните групи D4(+)) и D9(+)) на изследваните примати. Този ефект обаче се редуцира с нарастването на преживяемостта след исхемията, като броят на BrdU(+) клетки системно намалява към края на краткосрочната група D15(+)). В дългосрочните групи D23(+)) и D44(+)) количеството на пролифериращите клетки постепенно се увеличава. Очевидно времето на преживяемостта след последната апликация на BrdU също оказва съществено значение за намаляване количеството на BrdU(+) клетки. Считаме, че при възрастните животни тенденцията за редуциране на количеството BrdU(+) клетки в групите с по-дълга преживяемост D23(+)) в сравнение с контролната група и тези с по-къса преживяемост D4(+)) и D9(+)) и D15(+)) се дължи главно на многократното делене на клетките и намаляване концентрацията на BrdU в голяма част от пролифериращите клетки под необходимото ниво за имунохистохимичното регистриране на маркера. Друга възможна теза е прякото или косвено подтискащо влияние на исхемията върху клетъчната пролиферация чрез механизъм, който противодейства на стимулацията и в споменатите групи води до намаляване на BrdU(+) клетки. Наблюдаваното рязко повишение на пролиферацията в групата с най-продължителна преживяемост D44(+)) би могло да се дължи отново на преобладаващ стимулиращ ефект в хроничната фаза в по-дългосрочен план на базата на вече отпадналото подтискащо влияние, като резултат на отминаващия възпалителен процес след исхемията. Към подобна теза насочват данните и на други изследователи на пролиферацията в малкия мозък. Jung et al., след фокална мозъчна исхемия при плъхове доказват високи нива на микроглията след 28 ден (Jung et al.,

2009). Според Acosta et al. (2017) реактивната астроцитоза и секрецията на проинфламаторни цитокини насочват първичния възпалителен отговор към процес на отложена/забавена вторична увреда, с което те обясняват и високото ниво на глиални клетки 6 месеца след глобална мозъчна исхемия на малък мозък при примати.

При обработката на данните за клетъчната пролиферация в малкия мозък на контролната и исхемичните проби направи впечатление разликата в броя на BrdU(+) клетки между пробите от цереброцеребелума и спиноцеребелума, след което сравнихме пролиферацията между отделните слоеве – молекуларен, гранулозен и бяло вещество. При контролните животни спиноцеребелумът показва незначително по-голям брой BrdU(+) клетки и в трите изследвани зони. При исхемичните животни установихме тенденция за по-голям темп на *de novo* образувани клетки в цереброцеребелума и в трите слоя на животните от краткосрочните групи. При дългосрочната група D44(+), спиноцеребелумът има по-голям брой новообразувани клетки и в трите слоя, но статистически значима е само разликата между гранулозния слой и бялото вещество. В бялото мозъчно вещество по време на ембрионалното развитие и постнатално се намират прекурсори на глия и ГАВА(гама-аминомаслена киселина)-ергични неврони (доказано при плъхове, Leto et al., 2006), които при увреждане и нужда от репарация на мозъчната тъкан, биха могли да генерират нови неврони и/или глия. Цереброцеребелумът се развива паралелно с развитието на крайния мозък. Той участва в усъвършенстването на двигателната дейност - координацията и сръчностните волеви движения под контрола на крайномозъчната кора (Балтаджиев и сътр., 2016). Считаме, че като онто- и филогенетично по-нова структура, цереброцеребелумът реагира с по-усилена пролиферация и репарация в началните, решаващи съдбата на индивида етапи на мозъчната увреда, в частност при глобалната мозъчна исхемия.

6.3. Фенотипна изява на новообразуваните клетки в малкия мозък

В това изследване приложихме единично или комбинирано конвенционално утвърдени маркери за клетъчни типове и техни предшественици, характерни за отделните слоеве на малкия мозък при примати, във възрастов план и след исхемия.

Вниманието ни беше насочено предимно към колокализация на BrdU със специфични маркери за неврални стволони и прогениторни клетки, както и такива, показващи различна степен на съзряване при невроналната линия: PSA-NCAM, Tuj1, Calbindin и NeuN. Комбинирахме някои от гореспоменатите маркери и такива за транскрипционни маркери: Math5, Pax2 и Pax6. Други показателни маркери, които приложихме бяха GFAP за астроглия, Iba1 за микроглия и Vimentin за мезенхимни по произход клетки. Това съответства на широкото приложение на тези маркери за фенотипизиране на определени клетъчни типове в ЦНС (Namm et al., 2014; Luo et al., 2017).

При новородените животни установихме експресия на PSA-NCAM и Ki67 във външния гранулозен слой на кората на малкия мозък без да има колокализация. Това показва, че пролифериращите в този слой клетки са PSA-NCAM отрицателни. Възможно е да са млади развиващи се и мигриращи неврони, които не експресират повече този маркер или това са друг вид дялящи се клетки по-вероятно от групата на глията. В същото време липсата на коекспресия на PSA-NCAM и транскрипционния маркер Pax6 във външния гранулозен слой при тях потвърждава, че се касае за все още диференциращи се неврони, които експресират в по-ранните етапи на развитието си само PSA-NCAM, а по-късно само Pax6. Нашето наблюдение не корелира с това на Ponti et al., които при изследване на неврогенезата в малкия мозък при зайци описват малка субпопулация от PSA-NCAM(+)/Pax6(+) клетки при животните на 2 и 3 месечна възраст (перипубертетна), като след 4 месец клетки с такава колокализация вече не се намират (Ponti et al., 2008).

При тестванията във възрастов аспект и след различни по продължителност периоди на исхемия за наличието на специфични маркери за диференциране на млади неврони и тяхната зрялост DCX, Tuj1 и Calbindin и колокализацията им с BrdU, не намерихме данни за такава колокализация.

При анализ на група D23(+) в гранулозния слой намерихме единични клетки с едновременно наличие на клетъчния маркер за постмитотични зрели неврони NeuN и маркера за дялящи се клетки BrdU. При внимателен Z-stack анализ по трите оси се потвърди колокализацията на двата маркера. Предполагаме, че това са единични пролиферирали вече прогениторни клетки, които се диференцират като неврони. За уточняване на тази находка в

бъдеще се изисква използване на допълнителни специфични клетъчни маркери.

По отношение на количеството на Calbindin(+) клетки в ганглийния слой на малкомозъчната кора след исхемия определено се наблюдава значително намаление в броя на позитивните клетки при всички изследвани групи. Допускаме, че исхемията отключва изразена дегенерация и клетъчна смърт на клетките на Пуркиние, които в същност са Calbindin(+) клетки. Те са много чувствителни на исхемия поради високата си метаболитна активност. Тази наша находка напълно съответства на данните на някои автори при примати относно редуция на Calbindin(+) клетки на Пуркиние след транзиторна глобална мозъчна исхемия (Zola-Morgan et al., 1992; Acosta et al., 2017). Не изключваме обаче наличието на пролифериращи прекурсори, стимулирани от процеса на исхемия. За формирането на зрели клетки и експресията на Calbindin като техен маркер по всяка вероятност е необходим по-дълъг период от максималния, изследван от нас.

Като маркер за ранни неврални прекурсори и в следствие за зрели астроцити, GFAP се експресира от радиалната глия и невралните стволони клетки както в хода на пренаталната, така и на постнаталната неврогенеза при възрастни (Eckenhoff and Rakic, 1988; Maslov et al., 2004; Duan et al., 2015; Katsanos, 2017). При нашето изследване в част от групите след исхемично увреждане - D9(+), D15(+), D23(+) и D44(+), открихме на клетъчно-тъканно ниво единични данни за присъствието на новообразувани астроцити в кората на малкия мозък чрез колокализация на маркерите BrdU и GFAP. При внимателен анализ относно локализацията и морфологията на клетките с двойна експресия, както и съпоставката с данните за единично или множествено приложение на маркери от невроналната линия считаме, че тези клетки са изолирани астроцити. GFAP(+)/BrdU(+) клетки бяха открити и в слоя на клетките на Пуркиние. Смятаме, че това вероятно са клетки на Бергмановата глия, които при мозъчна увреда са способни да се делят (Seress et al., 1978; Abrahám et al., 2001) в отговор на нуждата от репарация на клетките на Пуркиние (Stamatakis et al., 2004; Sottile et al., 2006). Rusanescu and Mao при изследване на неврогенеза при мишки предполагат, че ролята на Бергмановата глия е в насочването на неврогенните прекурсори в зряла възраст, подобно на ембрионалното развитие (Rusanescu and Mao, 2017). Този резултат до голяма степен съответства на подобна находка на други

изследователи на малкия мозък при мишки (Su et al., 2014). Липсата на такава колокализация в останалите групи с исхемия насочва към отсъствие на нови астроцити, най-вероятно поради неизследвани от нас или наличие на неблагоприятни локално-времеви фактори.

Микроглията и астроцитите са главните клетъчни типове, които участват в процесите на възстановяване след увреда на мозъка. Тяхната дейност често е взимно свързана, синергична в името на оптималната функция и цялост на ЦНС (Liddelow et al., 2017). Клетки, показващи колокализация на маркерите BrdU и Iba1, които се използват съответно за клетъчна пролиферация и микроглиални клетки, са новообразувани микроглиоцити. След предизвикана исхемия се наблюдава значителна активация на микроглиални клетки в малкия мозък, както и образуване на нови такива. Като специфичен за микроглия и макрофаги Iba1 маркерът значително увеличава експресията си при редица мозъчни увреждания, включително и исхемия (Wirenfeldt et al., 2011). Данните от работата на Li et al. и на Gomez-Nicola and Perry, показват, че пролиферацията на локални/резидентни микроглиални клетки е основният източник за микроглиозата след исхемичен инцидент. Те наблюдават и описват делене на микроглия в реално време при исхемия (Li et al., 2013; Gomez-Nicola and Perry, 2015). В нашето изследване Iba1 маркерът се експресира както в здравия мозък при отделните групи във възрастов план, така и след исхемичната увреда в по-голям мащаб. Резултатите на други изследователи на пролиферацията в малкия мозък след фокална и глобална мозъчна исхемия при бозайници, показват също изявена и дългосрочна активация на Iba1(+) микроглия както в острата и подострата, така и в хроничната фаза (Jung et al., 2009; Acosta et al., 2017). Освен чрез фагоцитоза микроглиалните клетки участват активно при възпаление, травма, исхемия и други мозъчни нарушения както и при последващото тъканно възстановяване, като отделят цитокини и други сигнални молекули за взаимодействие с останалите клетъчни елементи (Gomez-Nicola and Perry, 2015; Bilbo and Stevens, 2017; Reu et al., 2017).

Нашите резултати за интензивна пролиферация на клетките на резидентната микроглия около 4 постисхемичен ден, спадът им около 15 ден и големия им брой в 44 ден са в съзвучие с резултатите на Acosta et al. за дългосрочна микроглиална пролиферация след глобална мозъчна исхемия. Считаме, че получените от нас резултати потвърждават и допълват наличните

от литературата данни за активацията и ролята на микроглията и астроглията след исхемични мозъчни нарушения при примати и по-специално за малкия мозък.

6.4. Експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6

В настоящото проучване представяме данни за присъствието, разпределението и динамиката в отделните слоеве на кората на малкия мозък на два съществени за ембрионалното и постнаталното му развитие транскрипционни фактора Pax2 и Pax6 при новородени, ювенилни и възрастни примати в норма и след исхемия. Те са от голямо значение за развитието и правилното позициониране на невроналните популации в отделните области на малкия мозък (Walcher et al., 2013; Namm et al., 2014).

Установихме, че експресията на двата фактора проявява възрастова зависимост с най-силна изява при новородените животни, значително намаление при едногодишните и още по-голямо редуциране при възрастните, с изключение на нормално изразената силна експресия на Pax6 в окончателния зърнест слой при израстналите животни. Считаме, че Pax2(+) клетки при новородените и едногодишните са невронални прогенитори, които мигрират от бялото вещество и в последствие се диференцират като ГАВА-ергични интерневрони в съответните слоеве на малкомозъчната кора (Leto et al., 2010; 2012). С увеличаване на възрастта експресията на Pax2 и Pax6 във EGL на кората на малкия мозък при изследваните примати намалява. С изчезването на външния зърнест слой и запазването на дефинитивния зърнест слой на мястото на вътрешния зърнест слой броят на Pax2(+) клетки рязко намалява, а броят на Pax6(+) клетки в този слой се запазва значително висок. Pax2 маркерът е типичен за ранните прекурсори на инхибиторните неврони след напускането на вентрикуларната зона (Selvadurai and Mason, 2011) в периода около последното им делене преди заемането на окончателното им местоположение в кората на малкия мозък (Schilling et al., 2008). Транскрипционният маркер Pax6 е характерен за зърнестите неврони в кората на малкия мозък (Martínez et al., 2013).

Установихме, че наблюдаваните от нас възрастови промени на експресията на двата транскрипционни фактора отговарят до голяма степен на известното за тях в литературата.

Глобалната мозъчна исхемия при възрастните животни в нашата експериментална постановка не оказва съществен ефект върху експресията на Рах2 и Рах6 в кората на малкия мозък. Необходими са в бъдеще някои двойни и тройни имунохистохимични оцветявания за установяване коекспресия на изследаните транскрипционни фактори с други маркери, посочващи определени фази на клетъчната диференциация на невроналните прекурсори до зрели неврони и евентуалната им функционална специализация.

7. Изводи

1. При изследваните примати пролиферативните процеси в малкия мозък след раждането и през първата година на постнаталната онтогенеза са най-интензивни, като постепенно намаляват с увеличаване на възрастта.

2. Ишемията при възрастните животни се оказва важен фактор, който от една страна стимулира клетъчната пролиферация в малкия мозък в краткосрочен план с намаляващ ефект във времето, а от друга страна действа инхибиращо в средносрочен план и отново стимулиращо в дългосрочен план.

3. Глобалната мозъчна ишемия води до по-интензивна клетъчна пролиферация в цереброцеребелума спрямо спиноцеребелума на малкия мозък.

4. Повечето от новообразуваните клетки след исхемично увреждане се диференцират в микроглия, астроцити или други неневрогенни клетъчни типове.

5. Имаме единични експериментални доказателства за образуване на нови неврони в кората на малкия мозък след ишемия.

6. Ишемията предизвиква изявена дегенерация на клетките на Пуркиние във всички изследвани групи възрастни животни спрямо контролната.

7. Транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 проявяват специфична локализация в отделните слоеве на кората на малкия мозък и характерна възрастова експресия.

8. Исхемичното увреждане в приложените срокове при възрастните животни не оказва съществен ефект върху експресията на Pax2 и Pax6.

8. Приноси на дисертационния труд

1. За първи път се представят сравнителни данни за клетъчната пролиферация в кората на малкия мозък във възрастов аспект при примати.

2. Оригинални са данните относно влиянието на глобалната мозъчна исхемия върху броя, разпределението и динамиката на новообразуваните клетки в отделните слоеве на малкомозъчната кора.

3. За първи път се представят сравнителни данни за клетъчната пролиферация в малкия мозък между церебро- и спиноцеребелума след исхемия.

4. Оригинални са данните за наличие на коекспресия на пролиферативния маркер BrdU с типични маркери за невроналната линия след исхемия.

5. Потвърждаващи и допълващи са резултатите относно увеличеното количество и активацията на микроглията и астроцитите както и данните за намаление броя на клетките на Пуркиние след исхемично увреждане при примати.

6. Оригинални са данните относно специфичната локализация и експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6 в отделните слоеве на кората на малкия мозък във възрастов аспект и след глобална мозъчна исхемия при примати.

9. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Mihaleva V**, Goranova V, Angelova M, Pavlov S, Yamashima T, Tonchev A. 2015. Cellular proliferation in the cortex of postischemic cerebellum by primates. *Варн Мед Фор* 4(1):5-9.
2. **Mihaleva V**, Pavlov S, Angelova M, Marinova D, Yamashima T, Goranova V, Tonchev A. 2016. Proliferating cells in the adult primate cerebellar cortex after ischemia. *Scr Sci Med* 48(3):73-77.
3. **Михалева В**, Маринова Д, Павлов С, Ангелова М, Горанова В, Ямашима Т, Тончев А. 2016. Експресия на транскрипционните фактори Рах2 и Рах6 в малък мозък на примати във възрастов аспект и след исхемия. *Варн Мед Фор* 5(2):63-67.

10. Участия в научни форуми

1. **Михалева В**, Ангелова М, Горанова В, Ямашима Т, Тончев А. Постисхемични ефекти върху клетките на малкомозъчната кора при възрастни примати. *XXII Национален Конгрес на БАД с международно участие*, Пловдив 5-7. 06. 2015.
2. **Mihaleva V**, Pavlov S, Angelova M, Marinova D, Yamashima T, Goranova V, Tonchev A. Proliferating cells in the adult primate cerebellar cortex after ischemia. *X International Symposium on Clinical Anatomy*, 6-8. 10. 2016.

Благодарности

Благодаря на научния ми ръководител - проф. Ваня Горанова за доверието, помощта и професионализма.

Благодаря на научния ми консултант - проф. Антон Тончев за предоставената възможност и ценните напътствия.

Благодаря на моите учители по Анатомия - доц. Минко Минков и г-жа Маргарита Трошева.

Благодаря на колегите ми - доц. Стоян Павлов, д-р Меглена Ангелова и д-р Десислава Маринова за подкрепата, ентузиазма и насърчението.

Благодаря на целия екип на катедрата по Анатомия и клетъчна биология за разбирането и стимулиращата работна обстановка.

Благодаря на семейството ми - съпруга ми Живко и дъщерите ми - Илиана и Гергана за любовта и търпението.