

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

Д-р Марин Димов Железов

АНАЛИЗ НА МИКРОГЛИЯ ПО ВРЕМЕ НА ПРЕНАТАЛНОТО РАЗВИТИЕ НА КРАЕН МОЗЪК ПРИ ЧОВЕК

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност:

„Анатомия, хистология и цитология“

Направление: 7.1 Медицина

Научен ръководител:

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

Научен консултант:

доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.

Варна, 2024

Дисертационният труд е оформен върху 138 стандартни машинописни страници. Литературният обзор е подкрепен от 6 фигури.

Секцията „Материали и методи“ е подкрепена от 3 таблици. Резултатите са подкрепени от 41 фигури и 25 таблици (това с броя на таблиците го добавям аз, ако не се слага го изтрийте). В дисертационния труд са използвани 185 литературни източника, от които 184 на латиница и 1 на български език.

Външни членове:

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

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н.
2. Доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.

Резервен външен член:

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

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Ваня Горанова Стефовска, д.м.

Официалната защита ще се състои на 28.03.2024 от 16:00 ч. в зала 330 на МУ-Варна, в комбинация с предварително насрочена онлайн среща.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	6
2. УВОД	7
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
3.1. Цел	9
3.2. Задачи	9
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
4.1. Обект на изследване и получаване на тъкани от човешки фетални мозъци	10
4.2. Обработка на тъканите	11
4.3. Микрографии	14
4.4. Анализ на изображенията	14
4.5. Статистически анализ	15
5. РЕЗУЛТАТИ	18
5.1. Анализ на IBA1 ⁺ клетки в палиума	19
5.1.1. Анализ на IBA1 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.	20
5.1.2. Анализ на IBA1 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.	23
5.1.3. Сравнение на гъстотата на IBA1 ⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.	28
5.2. Анализ на IBA1 ⁺ НАМ56 ⁺ клетки в палиума	29
5.2.1. Анализ на IBA1 ⁺ НАМ56 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.	29
5.2.2. Анализ на IBA1 ⁺ НАМ56 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.	33
5.2.3. Сравнение на процента IBA1 ⁺ НАМ56 ⁺ клетки от всички IBA1 ⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.	37
5.3. Анализ на IBA1 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума	39
5.3.1. Анализ на IBA1 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.	39
5.3.2. Анализ на IBA1 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.	43
5.3.3. Сравнение на процента IBA1 ⁺ KI67 ⁺ клетки от всички IBA1 ⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.	48
5.4. Анализ на SOX2 ⁺ клетки в палиума	49
5.4.1. Анализ на SOX2 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.	49

5.4.2.	Анализ на SOX2 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.	56
5.4.3.	Сравнение на процента SOX2 ⁺ клетки от всички DAPI ⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с. .60	
5.5.	Анализ на SOX2 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума	62
5.5.1.	Анализ на SOX2 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.	62
5.5.2.	Анализ на SOX2 ⁺ KI67 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.	64
5.5.3.	Сравнение на процента SOX2 ⁺ KI67 ⁺ клетки от всички SOX2 ⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.	68
5.6.	Корелации между микроглия и прогенитори.	69
5.6.1.	Корелации между микроглия и прогенитори по седмица и регион	70
5.6.2.	Корелации между микроглия и прогенитори в отделните зони на палиума сумарно за 17. и 20. г.с.	71
5.6.3.	Корелации между микроглия и прогенитори по седмица, регион и зона	72
6.	ДИСКУСИЯ.	75
6.1.	Обяснение и обосновка на използвания модел при проучването . . .	75
6.1.1.	Резюме на модела	75
6.1.2.	Обосновка за избора на конкретните два времеви периода . .	76
6.1.3.	Обосновка за избора на сравнения	76
6.1.4.	Обосновка за избора на корелации	78
6.1.5.	Обосновка на използвания статистически модел.	79
6.1.6.	Ограничения и недостатъци на настоящото проучване.	81
6.2.	Анализ на микроглия в палиума	81
6.2.1.	Специфично разпределение на IBA1 ⁺ в герминативните зони и динамика във времето	81
6.2.2.	Субпопулации IBA1 ⁺ НАМ56 ⁺ показват различно разпределение и динамика от IBA1 ⁺	85
6.2.3.	Пролиферацията на микроглия е малка и хомогенна по отношение на зоните и времевите периоди	88
6.3.	Анализ на прогенитори	89
6.4.	Корелации между микроглия и прогенитори.	90
6.4.1.	Корелации в палиума като цяло	90
6.4.2.	Корелации при сумирани времеви периоди	93
6.4.3.	Корелации при пълни разбивки по период и зона	94

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
8. ИЗВОДИ	97
9. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	98
10. ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	99
10.1. Публикации	99
10.2. Доклади	99
11. БЛАГОДАРНОСТИ	100

1. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

aIPCs	apical intermediate progenitor cells, априкални интермедиерни прогенитори
aRGCs	apical radial glial cells, апикална радиална глия
bIPCs	basal intermediate progenitor cells, базални интермедиерни прогенитори
bRGCs	basal radial glial cells, базална радиална глия
BPs	basal progenitors, базални прогенитори
CI	confidence interval, интервал на доверителност
CP	cortical plate, кортикална плочка
dSP	deep subplate, дълбока подова плочка
IPCs	intermediate progenitor cells, интермедиерни прогенитори
iSP	intermediate subplate, междинна подова плочка
iSVZ	inner subventricular zone, вътрешна субвентрикулна зона
IZ	intermediate zone, интермедиерна/междинна зона
LGE	lateral ganglionic eminence, латерална ганглионна еминенция
LPS	lipopolysaccharide, липополизахарид
MGE	medial ganglionic eminence, медиална ганглионна еминенция
MZ	marginal zone, маргинална зона
NA	not available, липсва
oSVZ	outer subventricular zone, външна субвентрикулна зона
RGCs	radial glial cells, радиална глия
SE	standard error, стандартна грешка
sSP	superficial subplate, повърностна подова плочка
SP	subplate, подова плочка
SVZ	subventricular zone, субвентрикулна зона
tRGCs	truncated radial glial cells, скъсена радиална глия
VZ	ventricular zone, вентрикулна зона
г.с.	гестационна седмица
ХСК	хемопоеични стволови клетки
ЦНС	централна нервна система

2. УВОД

Един от най-вълнуващите въпроси в медицината с голямо практическо значение е регулацията на развиващата се нервна система. Само за няколко месеца от една първоначална клетка получаваме вероятно най-комплексния обект в наблюдаваната вселена.

Развитието на мозъка следва строго определени етапи и критични периоди, през които се формират множество транзитни зони и структури, които драстично се променят в хода на развитието. Макар невроните в адултния мозък да са със сравнително малки пролиферативни способности, ограничени до няколко нишови зони, то ситуацията при пренаталния мозък е коренно различна. Неврогенезата тогава е изключително динамичен и активен процес. Действително, тези ѝ характеристики правят развиващия се мозък раним за патологични фактори.

При все повече неврологични заболявания, включително шизофрения, аутизъм, дори някои злокачествени мозъчни тумори, се откриват проблеми по време на развитието като ключови моменти при тяхната патогенеза. Ето защо изучаването на контрола на неврогенезата, съответно основните фактори, които могат да бъдат нарушени, е обещаващ подход за разбирането на тези заболявания.

Изучени са най-подробно огромен брой транскрипционни фактори, чиято оркестрирана активация и дезактивация влияе на пролиферацията, оцеляването, миграцията и диференциацията на невроналните прогенитори. Но през последните години започна да се обръща все по-голямо внимание на негенетичните регулатори на неврогенезата.

Ключов играч тук се оказват микроглиалните клетки. Почти век след откриването им те остават на заден план в изследванията на мозъчното развитие. С десетилетия за тях се приемаха някои грешни схващания, които сравнително неотдавна бяха оборени: 1. че микроглията са мозъчни макрофаги, които произхождат от костния мозък, и 2. че повечето микроглиални клетки през повечето време изпълняват пасивна роля и се активират единствено при патологични процеси. Тъй като развитието е нормален физиологичен процес, доскоро не се допускаше, че те могат да имат активна роля при него.

Нарастващ брой проучвания при животни показаха точно обратното. Микроглията не произлиза от хематопоеични прогенитори, а от жълтъчния сак и суспектно навлиза в развиващата се нервна система точно преди началото на неврогенезата. Редица експерименти показват как инхибиция на микроглията драстично променя броя и пролиферацията на невроналните прогенитори. Изучено е как тя може да регулира неврогенезата, от една страна, чрез фагоцитиране на клетки и синапси и индукция на апоптоза и, от друга страна – чрез локална секреция на разтворими и трофични фактори, които да стимулират развиващите се прогенитори и подпомагат формирането на връзки между тях. Още повече че все повече данни показват как микроглията се състои от хетерогенни субпопулации клетки, вероятно с различни роли.

Този многообразен набор от функции предполага, че приносът на микроглията по време на развитието на мозъка е значим и трябва да бъде изучен по-подробно заедно с нейното развитие. Макар да има голям обем данни от изследвания при животни, проучвания при човек почти липсват. Това допълнително се затруднява от трудната достъпност на ембрионални тъкани и нуждата да се работи единствено с корелации. Изучаването на ролята на микроглията при развитието на човешкия мозък е приоритет предвид наличието на болести, характерни единствено при човек. Бидейки и имунна клетка, микроглията е главен медиатор между патологичните процеси по време на вътреутробното развитие и последващите увреждания и промени, асоциирани с човешката психо- и невропатология.

Настоящото проучване изследва подробно пренаталното развитие на микроглията и някои нейни субпопулации в палиума при човек и търси корелации между тях и неврогенезата в два ключови времеви периода.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1. Цел

Целта на настоящото изследване е да проучи количеството и разпределението на микроглиални клетки в герминативните зони на дорзалния теленцефалон при човек, по време на пиковия временен интервал на неврогенеза в този регион, както и да се изследва корелацията между микроглия и прогениторна пролиферация.

3.2. Задачи

За да изпълним горепосочената цел, си поставихме следните задачи:

1. Получаване на тъкани от човешки фетален теленцефалон от 17. и 20. г.с.
2. Извършване на имунофлуоресцентни оцветявания за маркери на микроглия, прогениторни клетки и клетъчна пролиферация и микрографиране на оцветяванията.
3. Фенотипизация и околичествяване на клетките, маркирани със специфични антитела.
4. Избиране на подходящ статистически модел за обработка на данните
5. Корелиране на получените данни.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Обект на изследване и получаване на тъкани от човешки фетални мозъци

Този научен проект е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. д-р П. Стоянов”, Варна с протокол-решение №19/05.04.2012 с първо удължение с протокол-решение №55/16.06.2016 и второ удължение с протокол-решение №86/26.09.2019.

В проучването включихме тъканен материал от мозъци от човешки фетуси на възраст 17. и 20. г.с. (табл. 4.1.).

Одобрени за включване в изследването бяха единствено мъртви фетуси от спонтанни аборти или изкуствено-индуцирани аборти по медицински показания. Материали от аборти по желание не са включени в проучването. Фетуси с морфологични аномалии или установена невропатология не са включени в проучването. Всички тъкани са придобити след приключване на аборта и получаване на писмено съгласие от майката (пациента).

Табл. 4.1. Случаи, включени в проучването по реда на получаване на тъканните проби

Случай №	Гестационна възраст	ПСИ
1.	20. г.с.	30 мин.
2.	17. г.с.	30 мин.
3.	20. г.с.	5 ч.
4.	20. г.с.	2 ч. 30 мин.
5.	20. г.с.	2 ч. 30 мин.
6.	20. г.с.	6 ч.
7.	17. г.с.	25 мин.
8.	17. г.с.	20 мин.
9.	16-17. г.с.	22 мин.

г.с. – гестационна седмица; ПСИ– послесмъртен интервал

4.2. Обработка на тъканите

Фиксация и консервиране

Послесмъртният интервал от времето на установяването на смъртта до запазването на тъканите е между 30 минути и 6 часа.

Запазването на тъканите се осъществи по два начина: тъканните проби от всички без последните три фетуса от табл. 4.1. след вземането си са фиксирани в 10% буфериран формалин или 4% параформалдехид за две седмици.

Последните три фетуса след вземането си бяха веднага замразени цели на -80°C . Последва отстраняване на цялата глава, пробиване на отвори за по-добра пенетрация на фиксатора и нейното фиксиране в 10% буфериран формалин за две седмици на 4°C . След това мозъкът беше отпрепариран.

След фиксацията тъканите бяха консервирани и криопротектирани, като бяха преместени постепенно със застъпване в 10, 20 и финално 30% разтвор на захароза с натриев азид.

Изготвяне на криосрези

С цел изготвяне на криостатни криосрези тъканите бяха включени в среда. Последните три случая бяха включени в желатин.

Приготвяне на желатинова включваща среда:

1. 7,5 грама желатин се разтварят в 25 ml PBS (phosphate-buffered saline) на стайна температура до набъбване.
2. След набъбване се добавят още 25 ml PBS и 50 ml 30% разтвор на захароза и така се получава 100 ml краен разтвор на 7,5% желатин в 15% захароза-PBS.
3. Полученият разтвор се поставя в термостат на 65°C и периодично разбърква до пълно разтваряне.
4. След разтваряне се премества в термостат на 37°C заедно с тъканта (в отделен контейнер), която ще бъде включвана.
5. След темперирание тъканта се поставя в разтвора и инкубира на 37°C за два часа.
6. След инкубацията тъканта и разтворът се изливат в блокче и се преместват на 4°C за максимум три дни.
7. След втвърдяване на 4°C блокчето е готово за криосекция.

Останалите случаи бяха включени в О.С.Т. (Optimal Cutting Temperature) среда (Tissue-Tek О.С.Т. Compound, Sakura, USA) за едно денонощие.

Готовите включени препарати бяха замразени и нарязани на криостатен микротом (Leica CM3050S) на срези с дебелина 20 μm .

Готовите стъкла се съхраняваха на -20°C .

Имунофлуоресцентни оцветявания

Избор на антитела: Визуализирахме микроглията посредством маркера IBA1. Използвахме NAM56 за търсене на нейни субпопулации. Невроналните прогенитори визуализирахме чрез SOX2. За визуализация на пролиферация на микроглия и прогенитори използвахме KI67.

Протокол за имунофлуоресцентно оцветяване:

1. Подготвяне на цитратен буфер (pH 6) за антигенно възстановяване (Antigen Unmasking Solution, Citrate-Based H-3300, Vector Laboratories).
2. Темпериране на цитратния буфер, стъклата и PBS на стайна температура 15 мин.
3. Промиване на препаратите в PBS за 5 мин на стайна температура.
4. Ограждане с hydrophobic rep.
5. Антигенно възстановяване в цитратен буфер на 95°C в микровълнова печка (400 W) за три пъти по пет минути с междинно охлаждане до стайна температура.
6. Промиване с PBS 3x5 мин.
7. Блокиране за 1 час на стайна температура или 14 часа на 4°C с 10% нормален кози серум, разтворен в PBS (Cat. No S-1000, Vectorlabs).
8. Добавяне на първото първично антитяло, разтворено в PBS. За препарати, при които се търсят протеини с ядрена локализация, антителата бяха разтворени в 1% разтвор на Triton в PBS с цел пермеабилзация на клетъчните мембрани.
9. Инкубация на първичното антитяло за 12–14 часа на 4°C .
10. Промиване с PBS 3x5 мин.
11. Добавяне на вторично антитяло, разрежено в PBS.
12. Инкубация 2 часа на стайна температура на тъмно.
13. Промиване с PBS 3x5 мин.
14. Добавяне на второто първично антитяло и повтаряне на следващите стъпки колкото пъти е необходимо в зависимост от

броя на използваните първични антитела до добавяне и инкубиране на последното вторично антитяло.

15. Промиване с PBS 3x5 мин.
16. Добавяне на 4,6-диамино-2-фенилиндол (DAPI) (Vector Laboratories) за 10-20 мин на тъмно.
17. Промиване с PBS 3x5 мин.
18. Покриване с ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, USA.
19. Съхраняване на -20°C .

Използваните първични антитела са изброени в табл. 4.2., а вторичните – в табл. 4.3.

Табл. 4.2. Първични антитела, използвани в проучването

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Концентрация
IBA (rb)	Synaptic Systems	234013	1:100
IBA1 (chn)	Synaptic Systems	234006	1:50
HAM56 (mo)	DAKO	M0632	1:50
KI67 (mo)	DAKO	MIB-I M7240	1:100
KI67 (rb)	Thermo	9106	1:100
SOX2 (rb)	Chemicon	AB5770	1:100

Съкращения: rb – rabbit; chn – chicken; mo – mouse

Табл. 4.3. Вторични антитела, използвани в проучването

Антитяло	Производител	Продуктов номер	Концентрация
AF 488 gt (anti-mo)	Invitrogen	A11008	1:200
AF 488 gt (anti-rb)	Invitrogen	A11034	1:200
AF 488 gt (anti-chn)	Invitrogen	A11039	1:200
AF 546 gt (anti-mo)	Invitrogen	A21123	1:200
AF 546 gt (anti-rb)	Invitrogen	A10040	1:200
AF 546 gt (anti-chn)	Invitrogen	A11040	1:200
AF 568 gt (anti-mo)	Invitrogen	A11004	1:200
AF 568 gt (anti-rb)	Invitrogen	A11011	1:200
AF 568 gt (anti-chn)	Invitrogen	A11041	1:200
AF 647 gt (anti-mo)	Invitrogen	A21235	1:200
AF 647 gt (anti-rb)	Invitrogen	A21245	1:200
AF 647 gt (anti-chn)	Invitrogen	A21449	1:200

Съкращения: rb – rabbit; chn – chicken; mo – mouse

4.3. Микрографии

Микрографиите бяха изготвени на микроскоп Zeiss Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss GmbH) с моторизирана предметна масичка и високочувствителна монохромна CCD камера AxioCam Mrm rev.3 (Carl Zeiss GmbH).

Микроскопът се управлява чрез софтуера Axio Vision 4.9 (Carl Zeiss GmbH), снабден с модул за автоматично фокусиране.

Бяха заснети два вида снимки. При първия вид се сканира целият препарат и се получава голямо обзорно изображение тип мозайка. Тези изображения се използват за определяне локацията на заснемане на втория вид, при които се заснема единствено конкретното зрително поле или малка правоъгълна мозайка от четири зрителни полета. Тези малки микрографии са от една зона и не преминават границите ѝ. По този начин заснехме 5–10 от втория вид микрографии от всяка герминативна зона с обектив EC Plan-Neofluar 20x/0.50 с латерална резолюция от 0.65 $\mu\text{m}/\text{px}$.

По време на заснемането фокусната равнина се определи спрямо DAPI с нагласяне на фокусен offset за останалите канали. Целеше се хистограмите на всички канали да са разгърнати на около 80% с цел избягване на clipping.

Всички настройки на камерата за различните канали бяха поддържани постоянни, освен при необходимост експозицията с цел избягване на насищането, което изключително би затруднило анализа.

Получените мозайки бяха защити в едно цялостно изображение. Всички получени снимки бяха експортирани в нативния за Axiovision формат .zvi, а след това в .tiff, който позволява последваща обработка в друг софтуер. Отделно бяха запазени и метаданните за скалирането на образите.

4.4. Анализ на изображенията

Анализът на изображенията включва фенотипизиране и околичествяване на изследваните клетки.

За целта използвахме софтуера FIJI/ImageJ (Schindelin et al. 2012; Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012).

Експортираните в .tiff обзорни мозайки бяха мащабирани във FIJI спрямо запазените метаданни от оригиналните .zvi образи. При малки-

те снимки се работеше директно със .zvi формат, но отново чрез въвеждане на мащабирането. Разликата идва от по-удобната работа във FIJI с много големи образи, ако са в .tiff формат; при малките образи формата не се отразява на ефективността на работния процес.

За анализа на микроглиални клетки на площ в Axiovision бяха очертани границите на VZ на цялото изображение и площта беше автоматично изчислена от софтуера. Ограждането на такава голяма площ се наложи поради сравнително малката дебелина на зоната и ниската привидна гъстота на микроглия в нея. Клетките бяха фенотипизирани и преброени ръчно.

Във FIJI от обзорните мозайки изрязахме региони на интерес (ROIs) с известна площ за iSVZ и ги запазахме като отделни изображения. За всяка от останалите зони бяхме заснели по 5–10 от малките микрографии.

На така получените отделни изображения поставихме ROIs с известни размери и площ, в които ръчно се фенотипизираха и преброиха клетките. За избягване на свръхброенето бяха избрани две страни от ROI, при които да се включват пресечените клетки и две, при които – не.

За целта използвахме Multicout plug-in, който позволява запазване на извършеното броене като анотации към образите в отделен файл без промяна в информацията на самото изображение.

При анализа на маркерите за прогенитори във FIJI от .tiff файловете изрязахме отделни ROIs за VZ и iSVZ. При останалите зони очертахме ROIs в рамките на малките микрографии. Използвахме DAPI, за да подберем по 300 случайни ядра за всяка зона от всяка седмица, разпределени равномерно между изследваните индивиди. Фенотипизирането и броенето се извърши ръчно.

4.5. Статистически анализ

Получените стойности бяха въведени и подредени в .xlsx таблици. За статистическия анализ бе използван R language and environment for statistical computing and graphing (R Core Team 2014).

Данните, които ще анализираме, са наблюдения от експеримент с кръстосан факторен дизайн.

Изучават се ефектите на два фактора: гестационна седмица и зона. Гестационната седмица е пропорционална количествена променлива,

която е кръстосана (въздейства върху) с ефектите на другия фактор – зона. Изследвани са седем зони – VZ, iSVZ, oSVZ, IZ, dSP, sSP, CP.

Използвахме унифициран подход за регресия от семейството на негативните биномни регресии (Fox and Weisberg 2019) на наблюдаваните величини от следния тип:

$$\ln(\text{брой клетки}) \sim (\text{гестационна възраст} - 17) * \text{зона} + \text{offset},$$

където при показателите от тип „клетки на единица площ“ offset е площта, върху която сме броили, а за показатели от вида „% клетки“ (т.е. брой клетки на 100 кл) offset е реалният брой клетки, които сме наблюдавали, за да определим съответната фракция (например изброили сме 27 позитивни клетки в 300 DAPI клетки, което дава фракция 9% позитивни клетки).

Статистическата значимост на модела и ефектите на независимите фактори бе оценена с chi квадрат тест за отношение на логаритмичната подобност (logarithmic likelihood ratio) с редуцирани модели (при които факторите се изключват последователно). Този тест е аналогичен на ANOVA, който е неприложим за генерализирани модели.

Сигнификантен ефект от дадена независима променлива или взаимодействие между независими променливи означава, че допринася за обяснението на наблюдаваната вариация по-добре, отколкото, когато липсва (Fox and Weisberg 2019).

Оценихме размера на ефектите посредством post hoc тестване на интересующите ни групи не върху осреднените сурови данни, а посредством маргинални средни (marginal means).

При анализ на фракциите използваме генерализиран модел за бройни данни от negative Binomial семейство. Така сравненията дават информация за пропорциите на позитивните клетки (броя на 100 клетки).

За изследване на асоциацията между някои от избраните маркери беше извършен корелационен анализ на различни нива на стратификация: без стратификация във всички наблюдения, корелация в рамките на една и съща възраст, на една и съща зона и съответно по възраст и зона. Поради бройния (дискретен) характер на измерванията и малкия брой наблюдения на най-финото ниво на стратификация разпределението на наблюденията не отговаря на презумпциите за нормалност и линейност на анализа по Pearson. Затова като мярка за асоциацията беше избран

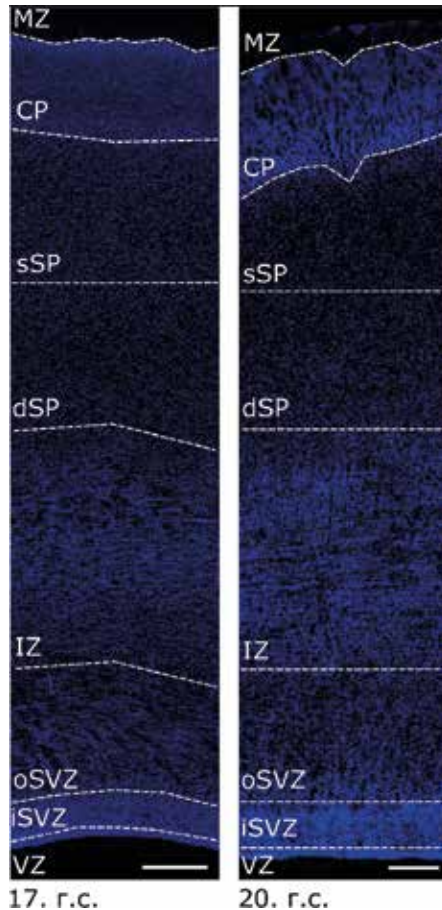
коэффициентът на монотонна асоциация по Spearman (рангов коэффициент на корелация по Spearman) (Lewis, 2015).

За нуждите на корелационния анализ в настоящата работа липсващите данни бяха заместени (импутирани) със средните стойности от еквивалентни наблюдения, като заместването се осъществи при спазването на следната йерархия в определянето на еквивалентността на наблюденията: 1. Други наблюдения от същия индивид; 2. Наблюдения от индивиди в същата гестационна възраст; 3. Наблюдения от другите изследвани зони при същия индивид. Еквивалентността от 1. ниво беше най-често използвана, а тази от 3. ниво се наложи да бъде използвана при най-малко наблюдения.

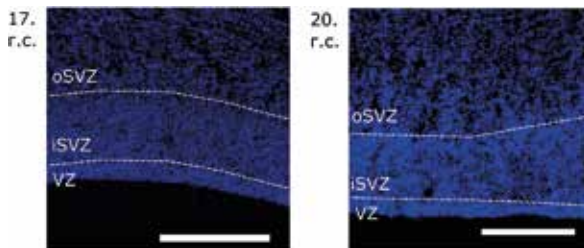
За минимална стойност, при която се приема статистическа значимост, беше избрана $p < 0,05$.

5. РЕЗУЛТАТИ

Идентифицирахме герминативните зони на палиума през 17. и 20. г.с. на хистологични препарати, оцветени с DAPI (фиг. 5.1. и 5.2.).



Фиг. 5.1. Оцветяване с DAPI на срез през цялата дебелина на мозъка през 17. и 20. г.с. Отбелязани са границите на герминативните зони.
Мащабна линия = 500 μm

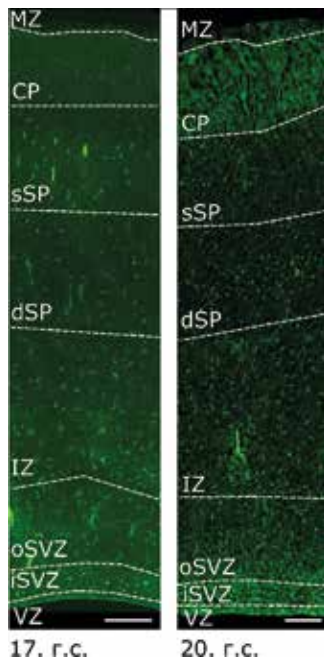


Фиг. 5.2. Оцветяване с DAPI на основните пролиферативни зони през 17. и 20. г.с. Машабна линия = 500 μ m

5.1. Анализ на IBA1⁺ клетки в палиума

Оцветихме за IBA1 хистологични срези на палиума от 17. и 20. г.с.

(.).



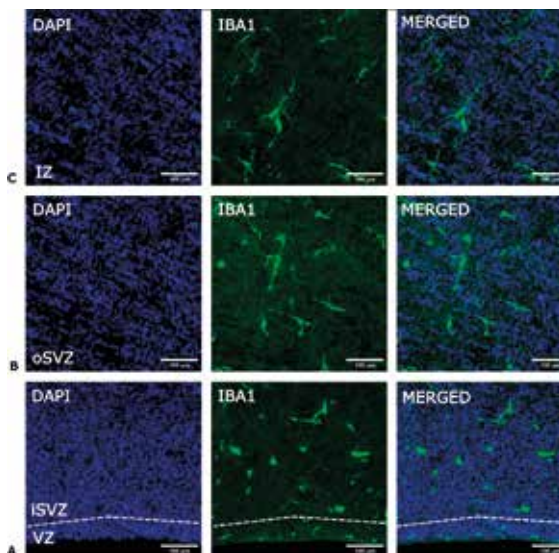
Фиг. 5.3. Оцветяване за IBA1 на срез през цялата дебелина на мозъка през 17. и 20. г.с. Отбелязани са границите на герминативните зони. Забележи разликата в гъстотата между dSP и sSP през 20. г.с. Машабна линия = 500 μ m

5.1.1. Анализ на IBA1⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

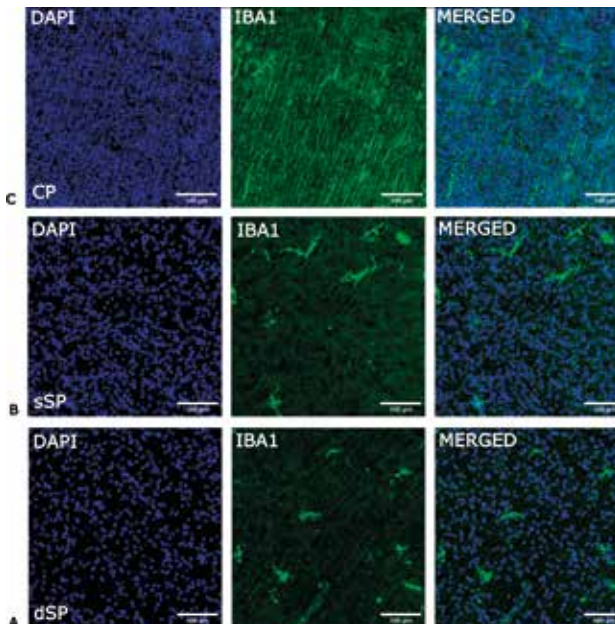
Гъстота на IBA1⁺ клетки в палиума през 17. г.с.: Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на IBA1⁺ клетки на 1 mm² във всички изследвани герминативни зони (от VZ до CP включително) на палиума през 17. г.с. (табл. 5.1., фиг. 5.4. и 5.5.).

Табл. 5.1. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на гъстота на IBA1⁺ клетки на 1mm² в герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Гъстота на IBA1 ⁺ клетки в палиума през 17. г.с.		
Зона	Маргинални средни	СИ
VZ	177,61	123,67 – 255,08
iSVZ	157,75	115,40 – 215,65
oSVZ	36,23	26,73 – 49,09
IZ	29,72	21,93 – 40,28
dSP	38,46	28,36 – 52,15
sSP	24,52	17,86 – 33,67
CP	20,70	14,32 – 29,94



Фиг. 5.4. Двойно оцветяване за IBA1 и DAPI през 17. г.с.
А. VZ и iSVZ; В. oSVZ; С. IZ. Машабна линия = 100 μ m



Фиг. 5.5. Двойно оцветяване за IBA1 и DAPI през 17. г.с.
A. dSP; **B.** sSP; **C.** CP. Машабна линия = 100 μm

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 17. г.с.

Сравнихме по двойки получените стойности за гъстота на IBA1⁺ клетки на mm^2 между основните пролиферативни зони (VZ, iSVZ, oSVZ) на палиума през 17. г.с. (табл. 5.2., фиг. 5.6.A). Не се установи статистически значима разлика между VZ и iSVZ, като двете зони съдържат приблизително еднакъв брой клетки. Значима е разликата в броя клетки между VZ и oSVZ, като VZ съдържа 4,9 пъти повече клетки от oSVZ (CI: 2,48 – 9,71; $p < 0.0001$). Сходни са резултатите при сравнение на iSVZ и oSVZ, показващи, че iSVZ съдържа 4,35 пъти повече клетки от oSVZ (CI: 2,32 – 8,18; $p < 0.0001$).

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 17. гс.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Сравнихме по двойки гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между всяка от останалите зони със съседната ѝ. Анализът на данните не показва статистически значима разлика между никоя двойка съседни зони (табл. 5.2., фиг. 5.6.B).

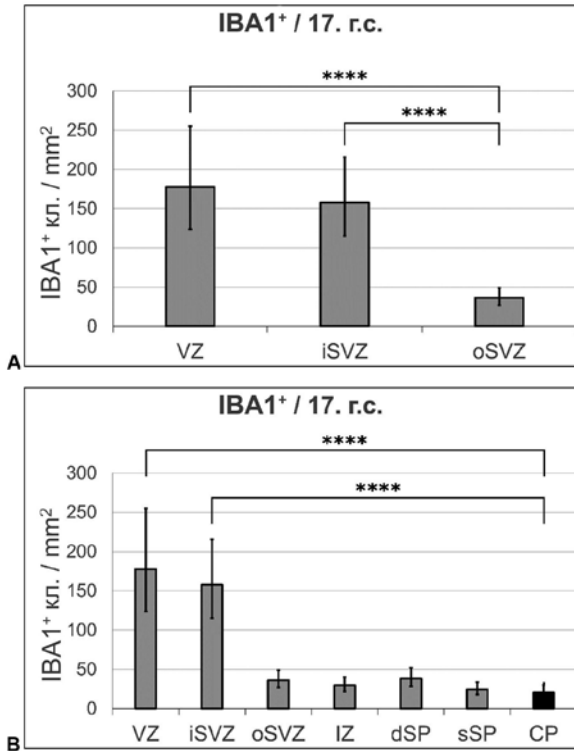
Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP в палиума през 17. гс.

VZ съдържа 8,58 пъти повече IBA1⁺ клетки от CP (CI: 4,08 – 18,06; $p < 0.0001$). Гъстотата на IBA1⁺ клетки в iSVZ е 7,62 пъти по-висока спрямо CP (CI: 3,79 – 15,30; $p < 0.0001$). Не се установи статистически-значима разлика при сравнението на никоя от останалите герминативни зони спрямо CP (табл. 5.2., фиг. 5.6.B).

Табл. 5.2. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между герминативните зони на палиума през 17. гс.

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ между зоните на палиума през 17. гс.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	1,13	0,56 – 2,25	0,9988
VZ / oSVZ	4,90	2,48 – 9,71	<0,0001****
iSVZ / oSVZ	4,35	2,32 – 8,18	<0,0001****
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,22	0,66 – 2,26	0,9652
IZ / dSP	0,77	0,42 – 1,44	0,8842
dSP / sSP	1,57	0,83 – 2,97	0,3646
sSP / CP	1,18	0,59 – 2,39	0,9920
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	8,58	4,08 – 18,06	<0,0001****
iSVZ / CP	7,62	3,79 – 15,30	<0,0001****
oSVZ / CP	1,75	0,88 – 3,48	0,1985
IZ / CP	1,44	0,72 – 2,85	0,7096
dSP / CP	1,86	0,93 – 3,70	0,1119
sSP / CP	1,18	0,59 – 2,39	0,9920
VZ / CP	8,58	4,08 – 18,06	<0,0001****

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Фиг. 5.6. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между герминативните зони на палиума през 17. г.с.
А. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ;
В. Сравнения между всяка зона спрямо CP
 * p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

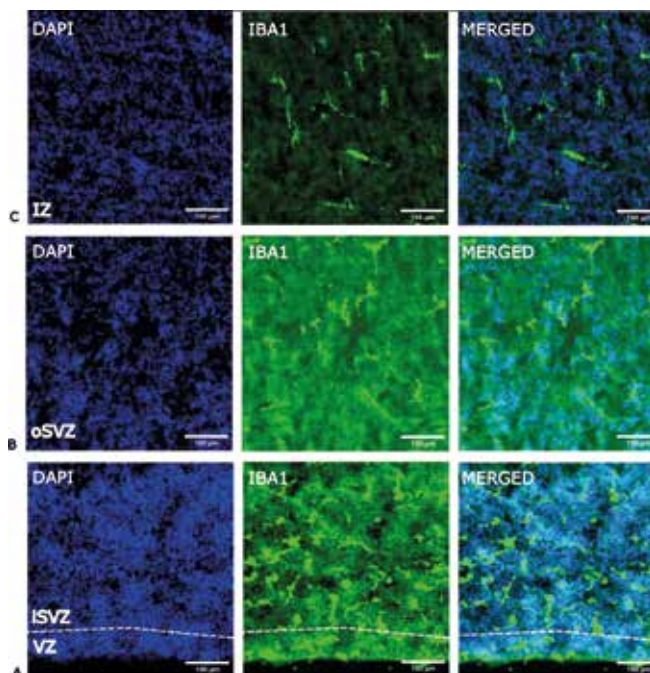
5.1.2. Анализ на IBA1⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

Гъстота на IBA1⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

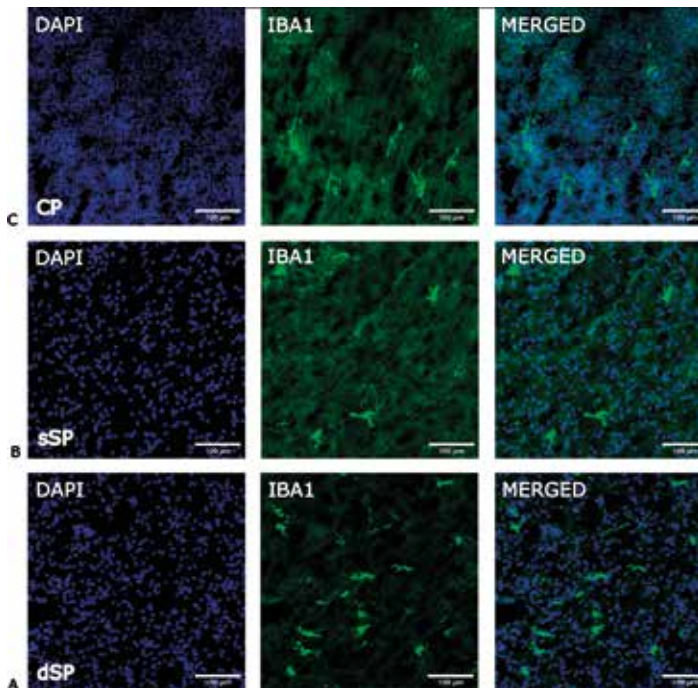
Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на IBA1⁺ клетки на 1 mm² във всички изследвани герминативни зони (от VZ до CP, включително) на палиума през 20. г.с. (табл. 5.3., фиг. 5.7. и 5.8.).

Табл. 5.3. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на гъстота на IBA1⁺ клетки на 1 mm² в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Гъстота на IBA1 ⁺ клетки в палиума през 20. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	345,58	259,97 – 459,38
iSVZ	395,96	302,65 – 518,04
oSVZ	57,10	43,66 – 74,67
IZ	48,38	37,00 – 63,28
dSP	47,15	35,86 – 61,98
sSP	25,94	19,48 – 34,54
CP	23,16	17,39 – 30,85



Фиг. 5.7. Двойно оцветяване за IBA1 и DAPI през 20. г.с. VZ и iSVZ; **В.** oSVZ; **С.** IZ
 Мащабна линия = 100 μ m



Фиг. 5.8. Двойно оцветяване за IBA1 и DAPI през 20. г.с.
 А. dSP; В. sSP; С. CP
 Мащабна линия = 100 μm

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 20. г.с.

Сравнихме по двойки получените стойности за гъстота на IBA1⁺ клетки на mm^2 между основните пролиферативни зони (VZ, iSVZ, oSVZ) на палиума през 20. г.с. (табл. 5.4., фиг. 5.9.A). Не се установи статистически значима разлика между VZ и iSVZ (отношение: 0,87; CI: 0,49 – 1,56; $p = 0,99$). VZ съдържа 6,05 пъти повече IBA1⁺ клетки от oSVZ (CI: 3,40 – 10,79; $p < 0.0001$). Гъстотата на IBA1⁺ клетки в iSVZ е 6,93 пъти по-висока от oSVZ (CI: 3,79 – 12,13; $p < 0.0001$).

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 20. гс.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Сравнихме по двойки гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между всяка от останалите зони със съседната ѝ (табл. 5.4., фиг. 5.9.B). Статистически значима разлика се откри единствено между dSP и sSP, като dSP съдържа 1,82 пъти повече клетки от sSP (CI: 1,02 – 3,25; p = 0,04).

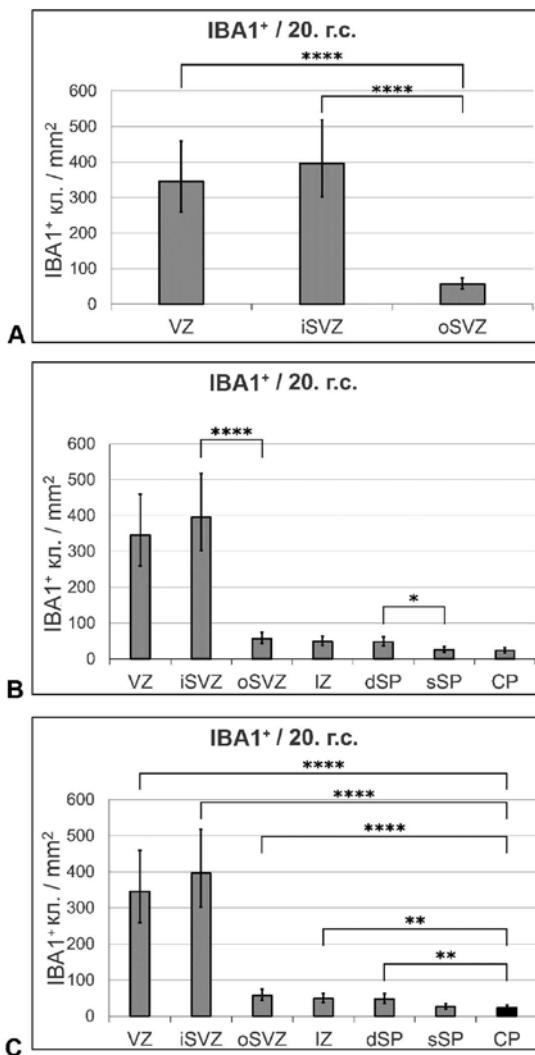
Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP в палиума през 20. гс.

VZ съдържа 14,92 пъти повече IBA1⁺ клетки от CP (CI: 8,19 – 27,16; p < 0.0001). Гъстотата в iSVZ е 17,09 пъти по-голяма спрямо CP (CI: 9,56 – 30,56; p < 0.0001). oSVZ съдържа 2,46 пъти повече клетки от CP (CI: 1,38 – 4,40; p < 0.0001). Гъстотата в IZ е 2,09 пъти по-голяма от CP (CI: 1,17 – 3,73; p < 0.01). dSP съдържа 2,04 пъти повече клетки от CP (CI: 1,13 – 3,65; p < 0.01). Няма статистически значима разлика между sSP и CP (отношение: 1,12; CI: 0,62 – 2,04; p = 0,99). Виж табл. 5.4. и фиг. 5.9.C.

Табл. 5.4. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между герминативните зони на палиума през 20. гс.

Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ между зоните на палиума през 20. гс.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	0,87	0,49 – 1,56	0,9930
VZ / oSVZ	6,05	3,40 – 10,79	<0,0001****
iSVZ / oSVZ	6,93	3,97 – 12,13	<0,0001****
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,18	0,68 – 2,06	0,9759
IZ / dSP	1,03	0,59 – 1,80	0,9999
dSP / sSP	1,82	1,02 – 3,25	0,0396*
sSP / CP	1,12	0,62 – 2,04	0,9979
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	14,92	8,19 – 27,16	<0,0001****
iSVZ / CP	17,09	9,56 – 30,56	<0,0001****
oSVZ / CP	2,46	1,38 – 4,40	0,0001****
IZ / CP	2,09	1,17 – 3,73	0,0032**
dSP / CP	2,04	1,13 – 3,65	0,0062**
sSP / CP	1,12	0,62 – 2,04	0,9979

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.9. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

A. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ;

B. Сравнение между съседните зони;

C. Сравнение между всяка зона спрямо CP

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.1.3. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.

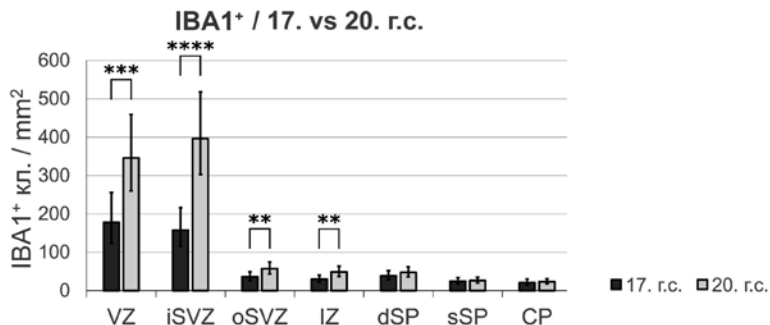
Сравнихме гъстотата на IBA1⁺ клетки между всяка зона от 20. г.с. с аналогичната ѝ от 17. г.с.: VZ на 20. г.с. сравнихме с VZ на 17. г.с. и т.н. (табл. 5.5., фиг. 5.10.). VZ на палиума през 20. г.с. съдържа 1,95 пъти повече IBA1⁺ клетки от VZ на палиума през 17 г.с. (CI: 1,33 – 2,84; $p < 0.0001$). iSVZ през 20. г.с. е с 2,51 пъти по-голяма гъстота от 17. г.с. (CI: 1,78 – 3,54; $p < 0.0001$). oSVZ през 20. г.с. е 1,58 пъти по-гъста от 17. г.с. (CI: 1,13 – 2,20; $p < 0,01$). IZ през 20. г.с. съдържа 1,63 пъти повече клетки от IZ на 17. г.с. (CI: 1,18 – 2,25; $p < 0,01$).

Не установихме статистически значима разлика в гъстотата на IBA1⁺ клетки между 20. и 17. г.с. при останалите зони на палиума.

Табл. 5.5. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

Сравнение на IBA1 ⁺ в аналогичните зони между 20. и 17. г.с.			
Зона	Отношение 20/17	CI	p
VZ	1,95	1,33 – 2,84	0,0006***
iSVZ	2,51	1,78 – 3,54	<0,0001****
oSVZ	1,58	1,13 – 2,20	0,0075**
IZ	1,63	1,18 – 2,25	0,0033**
dSP	1,23	0,87 – 1,72	0,2368
sSP	1,06	0,74 – 1,50	0,7542
CP	1,12	0,77 – 1,62	0,5519

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Фиг. 5.10. Сравнение на гъстотата на IBA1⁺ клетки на 1 mm² между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5.2. Анализ на IBA1⁺HAM56⁺ клетки в палиума

Оцветихме всички зони на палиума през двата времеви периода за IBA1 и HAM56. Околичествихме двойнопозитивните IBA1⁺HAM56⁺ клетки като процент (фракция) от всички IBA1⁺ клетки.

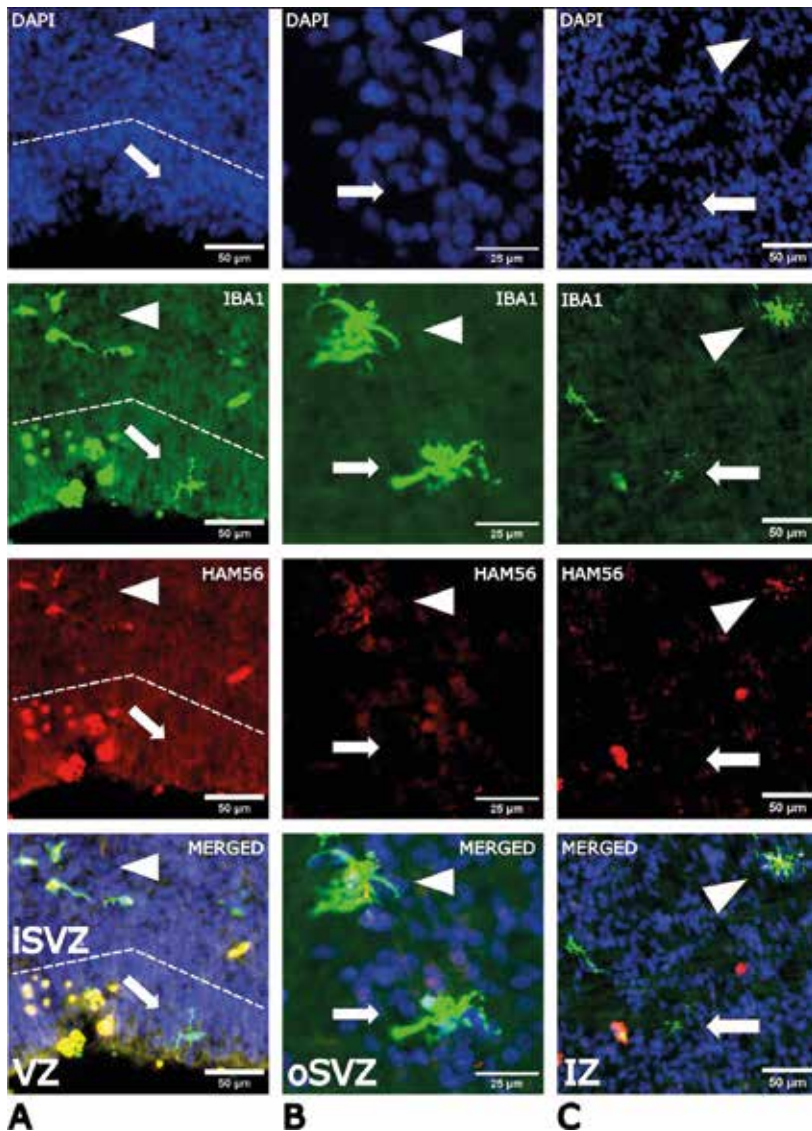
5.2.1. Анализ на IBA1⁺HAM56⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

Процент на IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

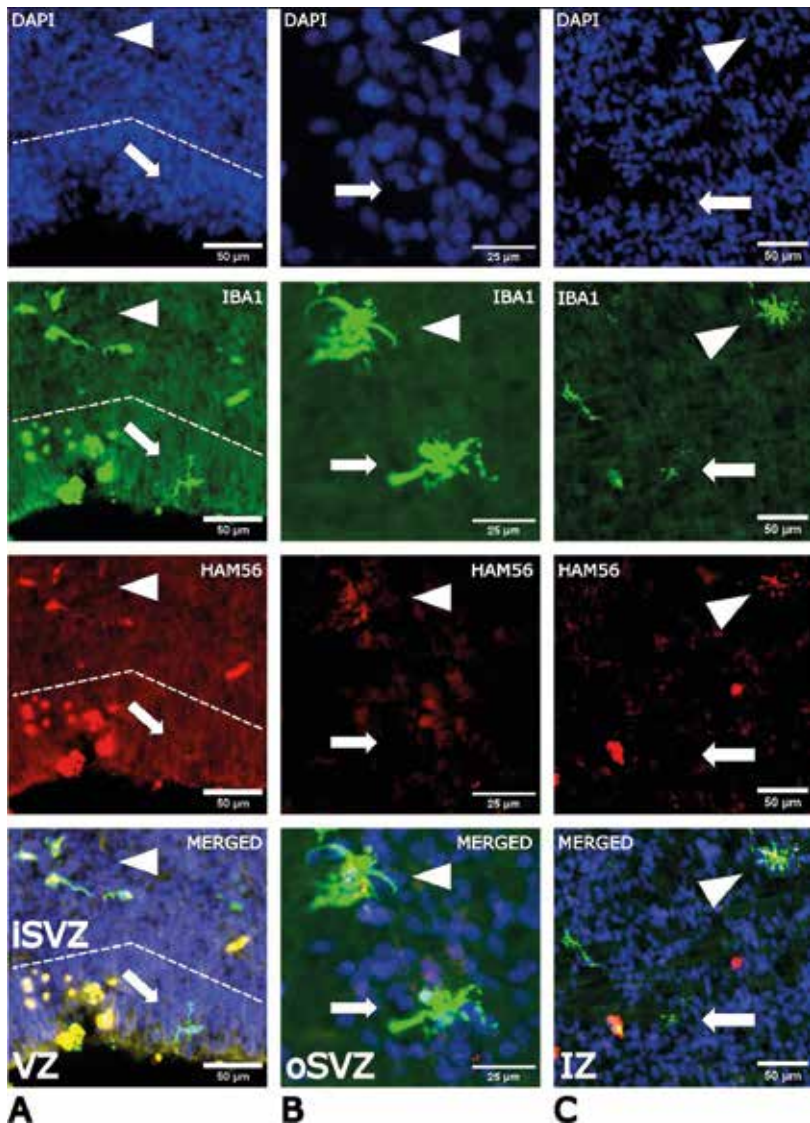
Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с. (табл. 5.6., фиг. 5.11. и 5.12.).

Табл. 5.6. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Процент на IBA1 ⁺ HAM56 ⁺ от IBA1 ⁺ в палиума през 17. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	3,15	1.06 – 9.35
iSVZ	20,11	9.67 – 41.84
oSVZ	7,56	3.64 – 15.71
IZ	4,83	2.23 – 10.47
dSP	5,03	2.30 – 10.99
sSP	1,71	0.49 – 5.89
CP	2,59	0.84 – 7.97



Фиг. 5.11. IBA1 и HAM56 в герминативните зони на палиума през 17. г. Къса стрелка: IBA1⁺HAM56⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺HAM56⁻ клетки
 А. VZ/iSVZ; В. oSVZ; С. IZ



Фиг. 5.12. IBA1 и HAM56 в герминативните зони на палиума през 17. г.с. Къса стрелка: IBA1⁺HAM56⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺HAM56⁻ клетки
 А. dSP; В. sSP; С. CP

Сравнение на процента IBA1⁺NAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 17. г.с.

Не установихме статистически значима разлика при никоя от сравнените двойки зони (табл. 5.7. и фиг. 5.13.).

Сравнение на процента IBA1⁺NAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 17. г.с.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Не установихме статистически значима разлика и при никоя от останалите двойки съседни зони (табл. 5.7. и фиг. 5.13.).

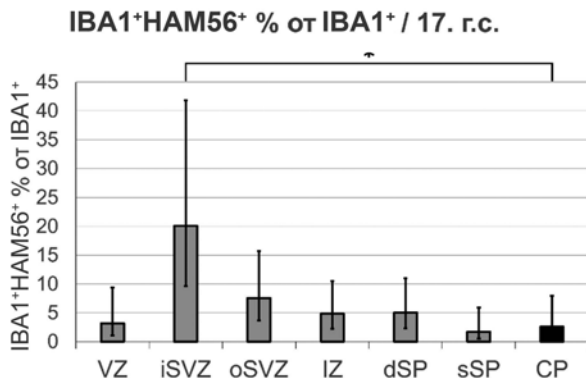
Сравнение на процента IBA1⁺NAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP през 17. г.с.

Установи се статистически значима разлика между iSVZ и CP, като процентът IBA1⁺NAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в iSVZ е 7,77 пъти повече от CP (CI: 1,15 – 52,41; p = 0.03). Няма статистически значима разлика между никоя от останалите зони спрямо CP (табл. 5.7. и фиг. 5.13.).

Табл. 5.7. Сравнение на процента IBA1⁺NAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Сравнение на процента IBA1⁺NAM56⁺ от IBA1⁺ между зоните през 17. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	0,16	0.02 – 1.04	0,0595
VZ / oSVZ	0,42	0.06 – 2.75	0,8171
iSVZ / oSVZ	2,66	0.61 – 11.59	0,4356
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,56	0.35 – 6.94	0,9747
IZ / dSP	0,96	0.21 – 4.5	0,9999
dSP / sSP	2,95	0.35 – 24.75	0,7441
sSP / CP	0,66	0.06 – 7.36	0,9987
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	1,22	0.13 – 11.36	0,9999
iSVZ / CP	7,77	1.15 – 52.41	0,0260*
oSVZ / CP	2,92	0.44 – 19.48	0,6377
IZ / CP	1,87	0.28 – 12.66	0,9614
dSP / CP	1,94	0.28 – 13.49	0,9513
sSP / CP	0,66	0.06 – 7.36	0,9987

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.13. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

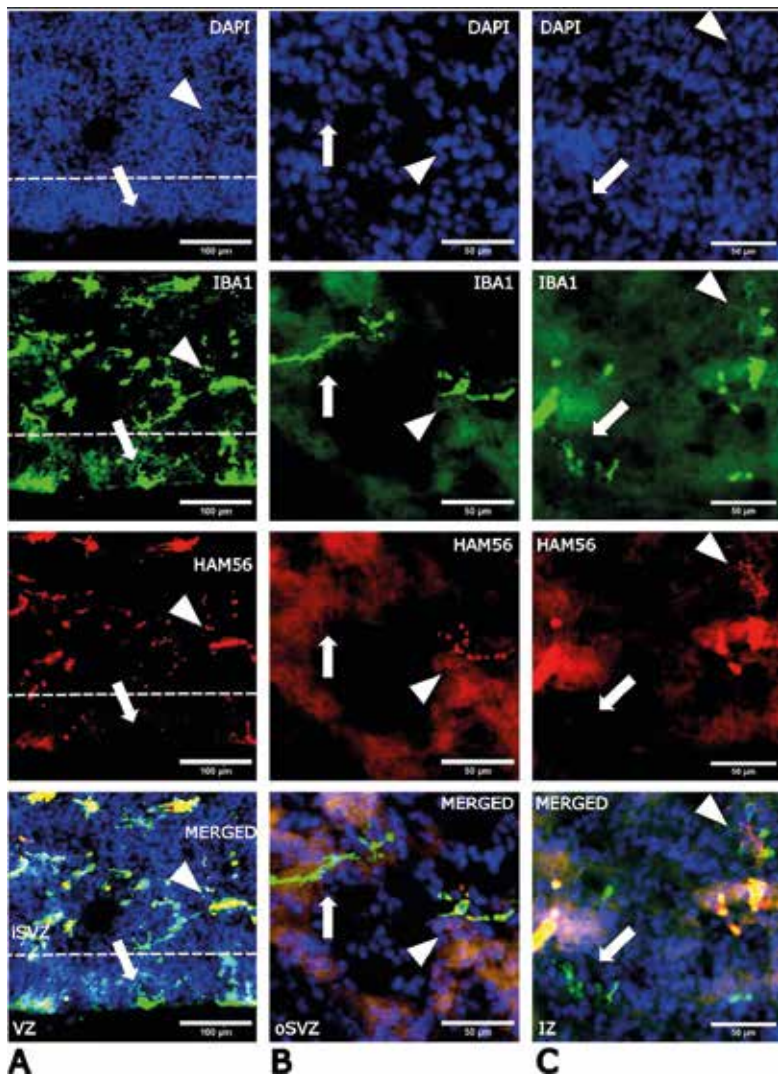
5.2.2. Анализ на IBA1⁺HAM56⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

Процент на IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

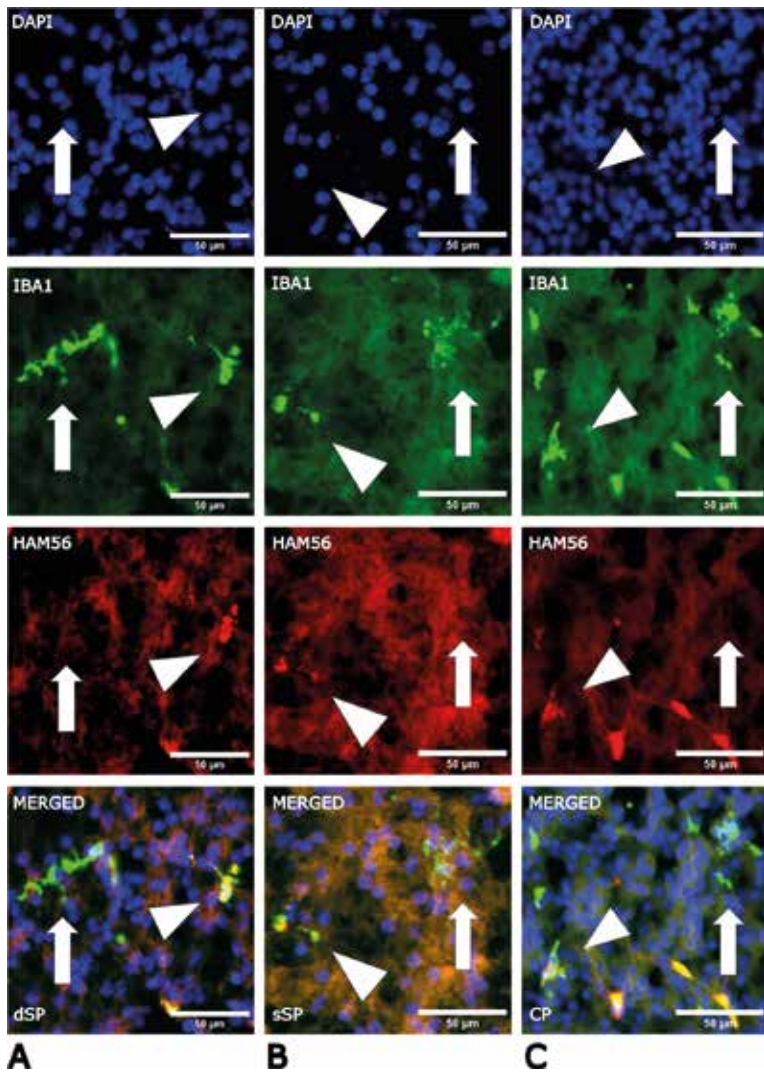
Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с. (табл. 5.8., фиг. 5.14. и 5.15.).

Табл. 5.8. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Процент на IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ в палиума през 20. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	20,66	10.86 – 39.34
iSVZ	44,33	24.84 – 79.12
oSVZ	32,03	17.83 – 57.54
IZ	20,48	11.22 – 37.38
dSP	9,51	5.00 – 18.08
sSP	3,59	1.47 – 8.82
CP	8,82	4.28 – 18.18



Фиг. 5.14. IBA1 и HAM56 в герминативните зони на палиума през 20. г.с. Къса стрелка: IBA1⁺HAM56⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺HAM56⁻ клетки
A. VZ/iSVZ; **B.** oSVZ; **C.** IZ



Фиг. 5.15. IBA1 и HAM56 в герминативните зони на палиума през 20. г.с. Къса стрелка: IBA1⁺HAM56⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺HAM56⁻ клетки
A. dSP; **B.** sSP; **C.** CP

Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 20. г.с.

Не се установи статистически значима разлика между VZ, iSVZ и oSVZ при сравнението им по двойки (табл. 5.9. и фиг. 5.16.).

Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 20. г.с.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Не се установи статистически значима разлика при никоя от останалите двойки съседни зони (табл. 5.9. и фиг. 5.16.).

Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP през 20. г.с.

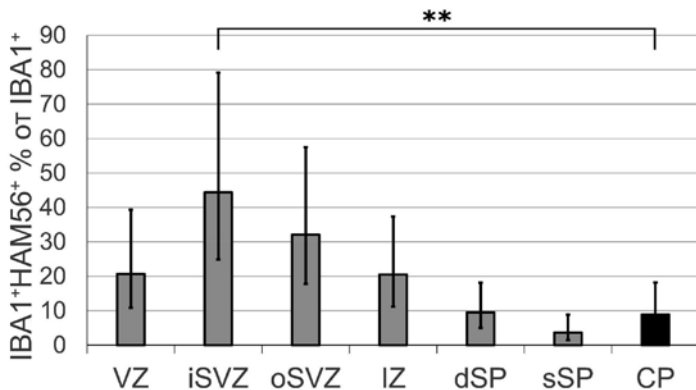
Анализът на данните показва статистически значима разлика между iSVZ и CP, като iSVZ съдържа 5,03 пъти повече от изследваните клетки спрямо CP (CI: 0,01 – 1,27; p = 0.01). Не се установи статистически-значима разлика между никоя от останалите зони спрямо CP (табл. 5.9. и фиг. 5.16.).

Табл. 5.9. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ между зоните през 20. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	0,47	0.13 – 1.69	0,5812
VZ / oSVZ	0,65	0.18 – 2.34	0,9537
iSVZ / oSVZ	1,38	0.41 – 4.63	0,9856
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,56	0.46 – 5.34	0,9356
IZ / dSP	2,15	0.59 – 7.8	0,5772
dSP / sSP	2,65	0.51 – 13.59	0,58
sSP / CP	0,41	0.07 – 2.27	0,7204
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	2,34	0.55 – 9.93	0,5891
iSVZ / CP	5,03	1.27 – 19.87	0,01**
oSVZ / CP	3,63	0.91 – 14.42	0,0848
IZ / CP	2,32	0.58 – 9.36	0,5599
dSP / CP	1,08	0.26 – 4.52	0,9999
sSP / CP	0,41	0.07 – 2.27	0,7204

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

IBA1⁺HAM56⁺ % от IBA1⁺ / 20. г.с.



Фиг. 5.16. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.2.3. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.

Процентните стойности на IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки бяха сравнени в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с (табл. 5.10. и фиг. 5.17.).

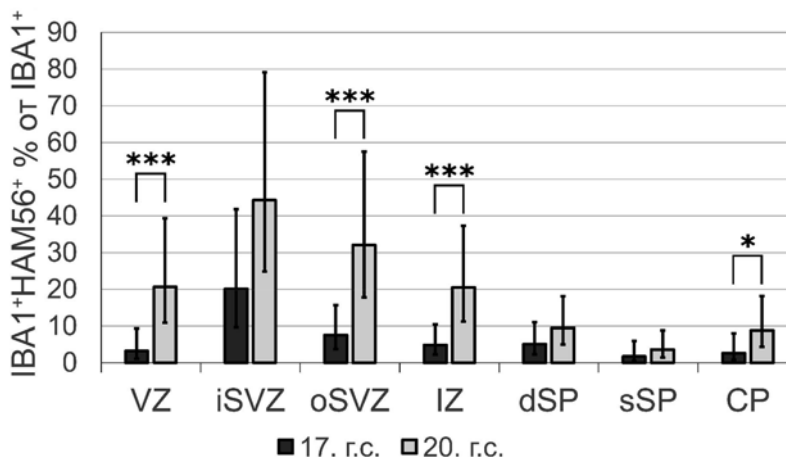
Статистически значима разлика се установи при следните сравнения: VZ през 20 г.с. съдържа 6,55 пъти повече от изследваните клетки спрямо VZ през 17 г.с. (CI: 2,15 – 19,99; p = 0,001). Гъстотата им в oSVZ на 20 г.с. е 4,24 пъти по-голяма спрямо oSVZ на 17 г.с. (CI: 1,92 – 9,37; p = 0,0004). IZ на 20 г.с. съдържа 4,24 пъти повече от изследваните клетки спрямо IZ на 17 г.с. (CI: 1,90 – 9,43; p = 0,0004). Гъстотата в CP на 20 г.с. е 3,41 пъти по-голяма от CP на 17 г.с. (CI: 1,18 – 9,81; p = 0,02). Не се установи статистически значима разлика при сравнението на останалите зони.

Табл. 5.10. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

Сравнение на % IBA1 ⁺ HAM56 ⁺ от IBA1 ⁺ между 20. и 17. г.с.			
Зона	Отношение 20/17	CI	p
VZ	6,55	2.15 – 19.99	0,001***
iSVZ	2,20	0.98 – 4.94	0,0548
oSVZ	4,24	1.92 – 9.37	0,0004***
IZ	4,24	1.90 – 9.43	0,0004***
dSP	1,89	0.82 – 4.36	0,1343
sSP	2,11	0.58 – 7.60	0,2550
CP	3,41	1.18 – 9.81	0,0232*

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

IBA1⁺HAM56⁺ % от IBA1⁺ / 17. vs 20. г.с.



Фиг. 5.17. Сравнение на процента IBA1⁺HAM56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.3. Анализ на IBA1⁺KI67⁺ клетки в палиума

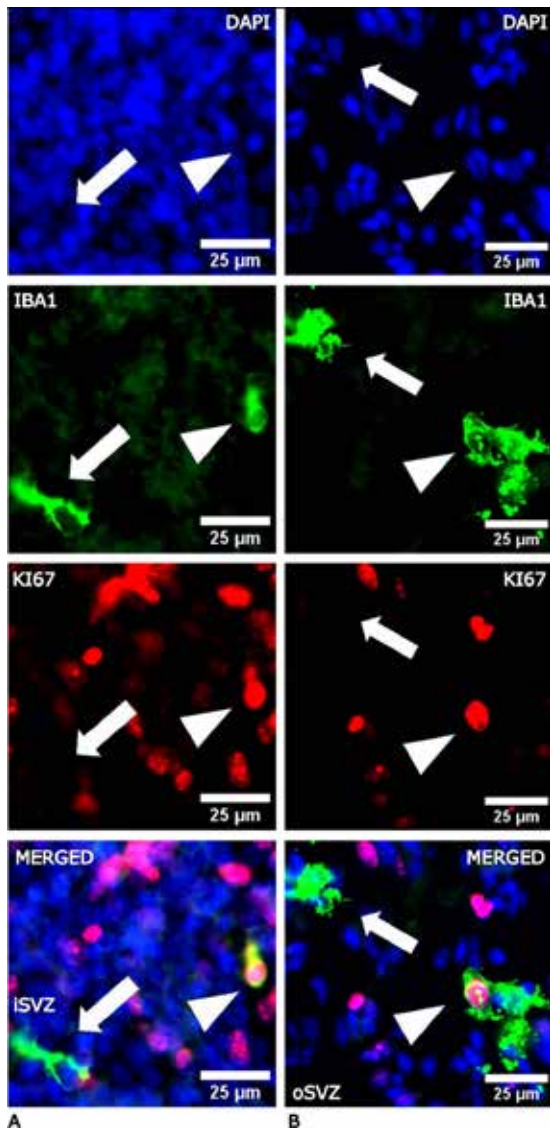
5.3.1. Анализ на IBA1⁺KI67⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

Процент на IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в палиума през 17. г.с.:

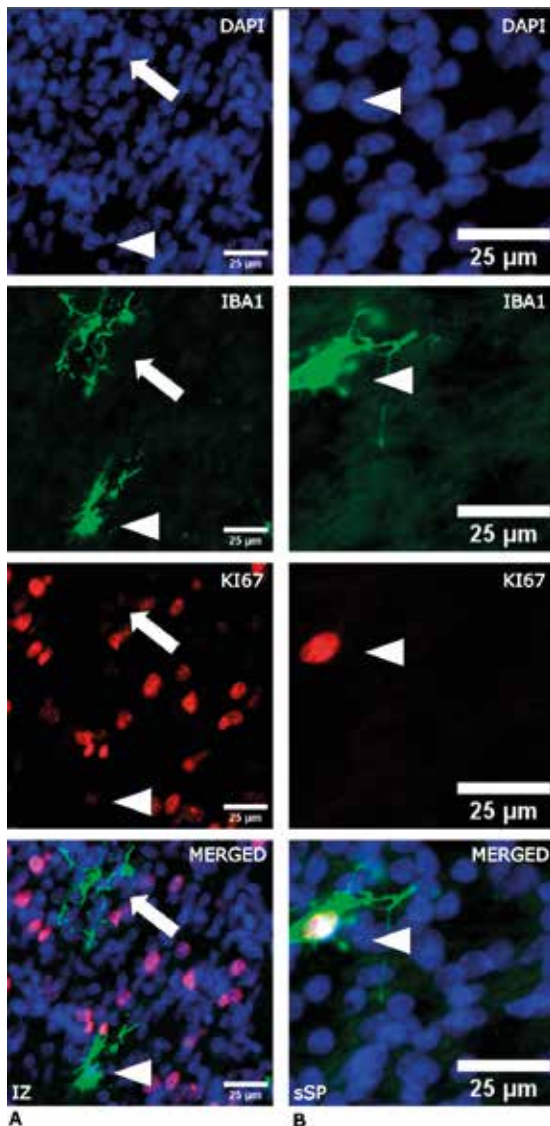
Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с. (табл. 5.11., фиг. 5.18. и 5.19.). Поради ниската гъстота на изследвания маркер, не открихме IBA1⁺KI67⁺ клетки дори на цял обзорец образ във VZ и dSP. За целта на последващия статистически анализ изчислихме маргиналните средни за тези две зони посредством импутация.

Табл. 5.11. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Процент IBA1 ⁺ KI67 ⁺ от IBA1 ⁺ през 17. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	1,51	0.09 – 24.73
iSVZ	4,93	1.32 – 18.41
oSVZ	5,16	2.25 – 11.80
IZ	7,04	3.48 – 14.25
dSP	1,40	0.37 – 5.26
sSP	1,64	0.37 – 7.25
CP	2,57	0.48 – 13.64



Фиг. 5.18. IBA1 и KI67 в герминативните зони на палиума през 17. г.с.
Къса стрелка: IBA1⁺KI67⁺ клетки;
дълга стрелка: IBA1⁺KI67⁻ клетки
А. iSVZ; В. oSVZ



Фиг. 5.19. IBA1 и KI67 в герминативните зони на палиума през 17. г.с.
 Къса стрелка: IBA1⁺KI67⁺ клетки;
 дълга стрелка: IBA1⁺KI67⁻ клетки
A. IZ; **B.** sSP

Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 17. г.с.

Не установихме статистически значима разлика при никоя от сравнените двойки зони (табл. 5.12. и фиг. 5.20.).

Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 17. г.с.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Не установихме статистически значима разлика и при никоя от останалите двойки съседни зони (табл. 5.12. и фиг. 5.20.).

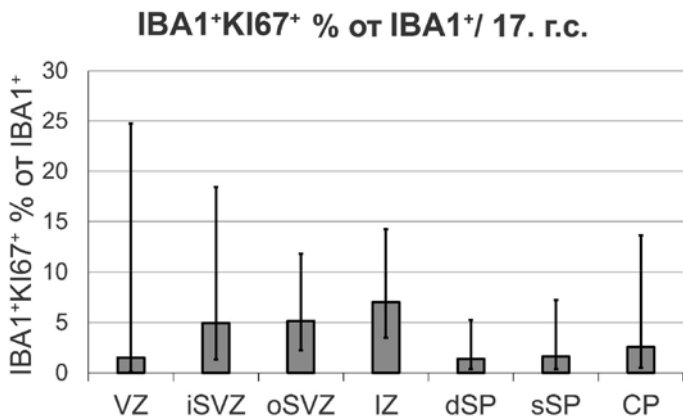
Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP през 17. г.с.

Не установихме статистически значима разлика между никоя от герминативните зони при сравнението ѝ с CP (табл. 5.12. и фиг. 5.20.).

Табл. 5.12. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Сравнение на % IBA1⁺KI67⁺ от IBA1⁺ между зоните през 17. г.с.			
Зони	Отноше- ние	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	0,31	0.00 – 25.31	0,9852
VZ / oSVZ	0,29	0.00 – 21.07	0,9789
iSVZ / oSVZ	0,96	0.10 – 8.96	0,9999
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	0,73	0.15 – 3.48	0,9970
IZ / dSP	5,02	0.63 – 39.87	0,2419
dSP / sSP	0,86	0.05 – 13.80	0,9999
sSP / CP	0,64	0.03 – 14.86	0,9995
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	0,59	0.01 – 63.03	0,9999
iSVZ / CP	1,92	0.10 – 37.53	0,9949
oSVZ / CP	2,01	0.13 – 30.22	0,9880
IZ / CP	0,55	0.03 – 10.68	0,9966
dSP / CP	0,64	0.03 – 14.86	0,9995
sSP / CP	0,59	0.01 – 63.03	0,9999

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



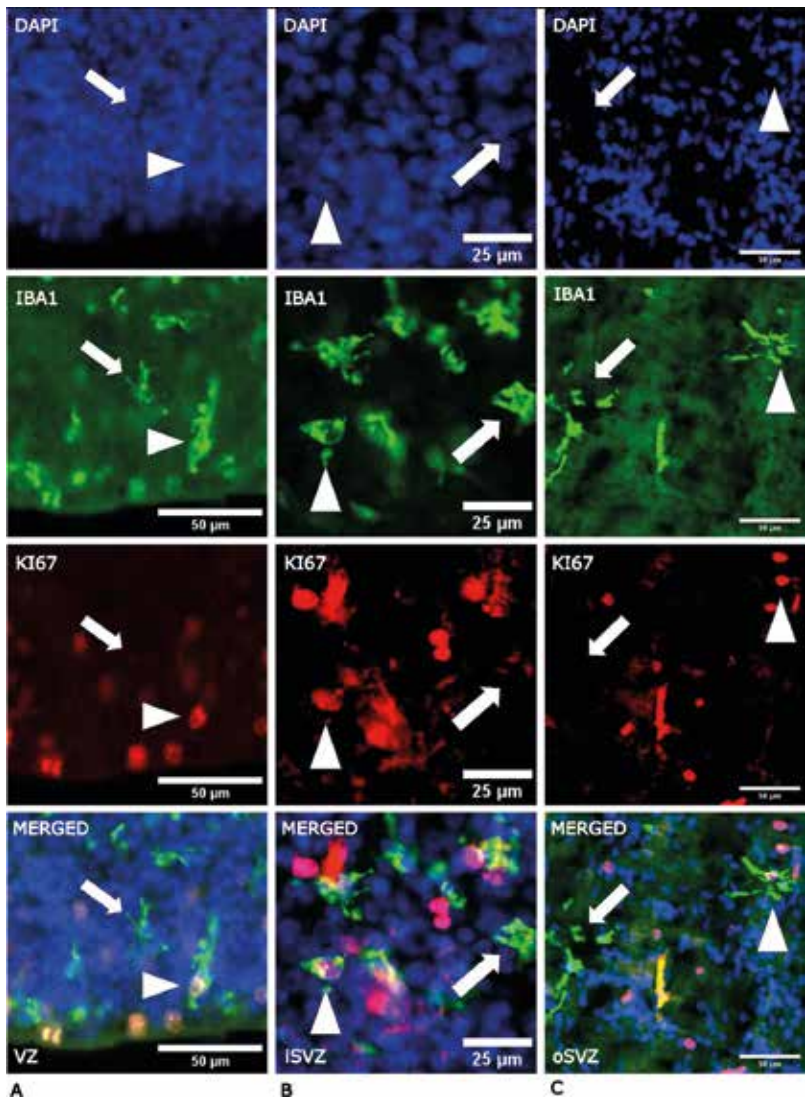
Фиг. 5.20. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.3.2. Анализ на IBA1⁺KI67⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

Процент на IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в палиума през 20. г.с. Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с. (табл. 5.13. и фиг. 5.21., 5.22. и 5.23.).

Табл. 5.13. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Процент IBA1 ⁺ KI67 ⁺ от IBA1 ⁺ през 20. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	4,42	0.61 – 31.82
iSVZ	7,78	3.80 – 15.89
oSVZ	3,74	1.67 – 8.37
IZ	8,86	4.92 – 15.96
dSP	3,50	1.40 – 8.74
sSP	2,36	0.69 – 8.01
CP	8,36	2.56 – 27.29



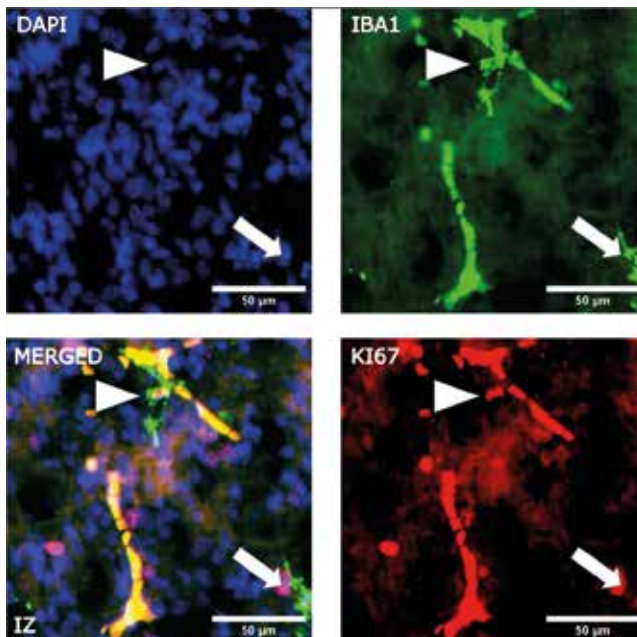
Фиг. 5.21. IBA1 и KI67 в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Къса стрелка: IBA1⁺KI67⁺ клетки;

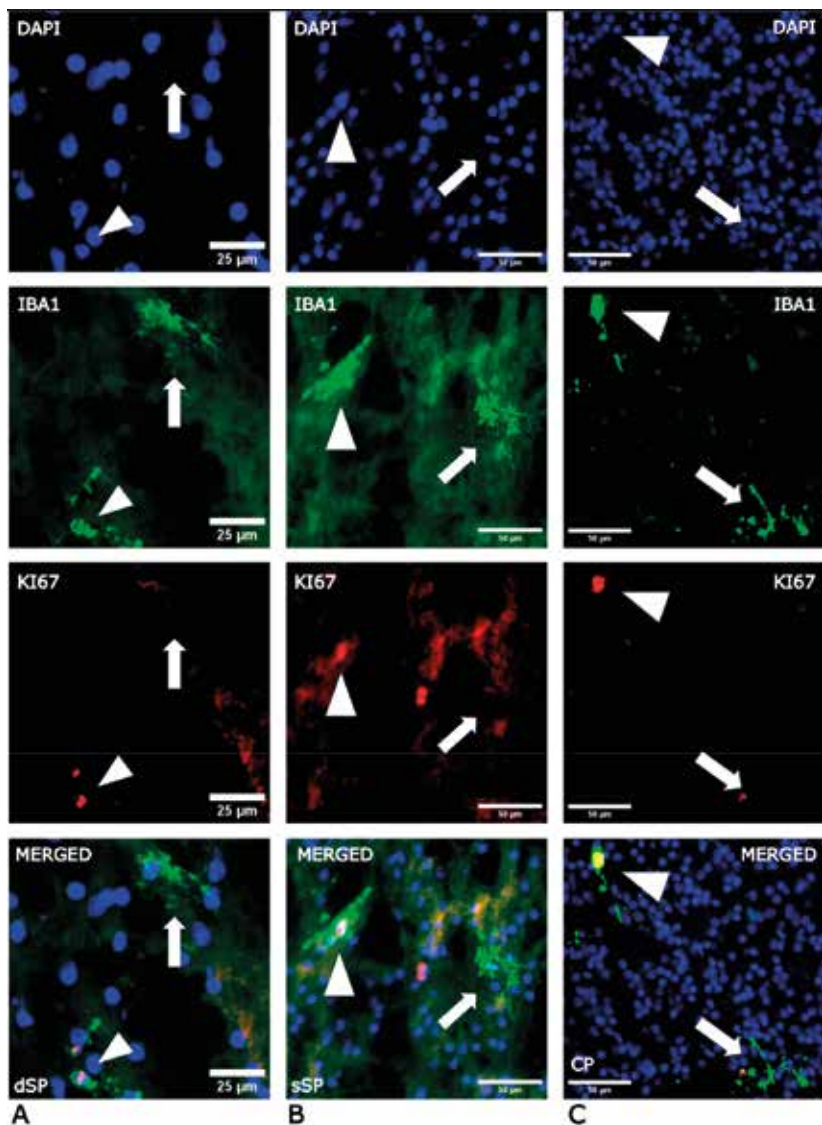
дълга стрелка: IBA1⁺KI67⁻ клетки

A. VZ; **B.** iSVZ; **C.** oSVZ

Мащабна линия: A. 50 μm; B. 25 μm; C. 50 μm



Фиг. 5.22. IBA1 и KI67 в IZ на палиума през 20. г.с.
Къса стрелка: IBA1⁺KI67⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺KI67⁻ клетки



Фиг. 5.23. IBA1 и KI67 в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Къса стрелка: IBA1⁺KI67⁺ клетки; дълга стрелка: IBA1⁺KI67⁻ клетки

A. dSP; B. sSP; C. CP

Машабна линия: A. 25 μm; B. 50 μm; C. 50 μm

Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 20. г.с.

Не установихме статистически значима разлика между VZ, iSVZ и oSVZ при сравнението им по двойки (табл. 5.14. и фиг. 5.24.).

Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 20. г.с.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Не установихме статистически значима разлика при никоя от останалите двойки съседни зони (табл. 5.14. и фиг. 5.24.).

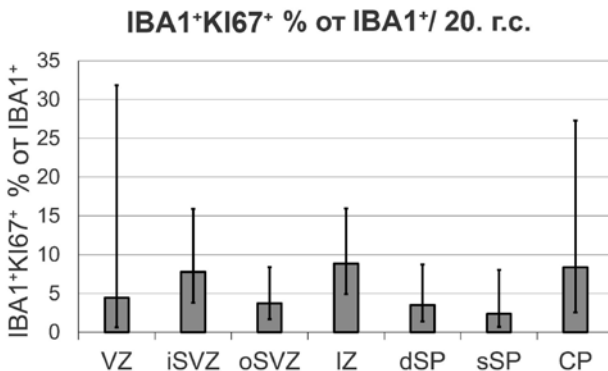
Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо CP през 20. г.с.

Анализът на данните не показва статистически-значима разлика между никоя от герминативните зони спрямо CP (табл. 5.14. и фиг. 5.24.).

Табл. 5.14. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Сравнение на % IBA1⁺KI67⁺ от IBA1⁺ между зоните през 20. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	0,57	0.03 – 12.79	0,9982
VZ / oSVZ	1,18	0.05 – 27.83	0,9999
iSVZ / oSVZ	2,08	0.43 – 10.15	0,8168
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	0,42	0.10 – 1.79	0,5684
IZ / dSP	2,53	0.52 – 12.30	0,5874
dSP / sSP	1,49	0.16 – 13.97	0,9985
sSP / CP	0,28	0.02 – 3.43	0,7422
Сравнение между всяка зона спрямо CP:			
VZ / CP	0,53	0.02 – 16.01	0,9979
iSVZ / CP	0,93	0.12 – 7.16	0,9999
oSVZ / CP	0,45	0.05 – 3.68	0,9176
IZ / CP	1,06	0.15 – 7.34	0,9999
dSP / CP	0,42	0.05 – 3.79	0,9038
sSP / CP	0,28	0.02 – 3.43	0,7422

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.24. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

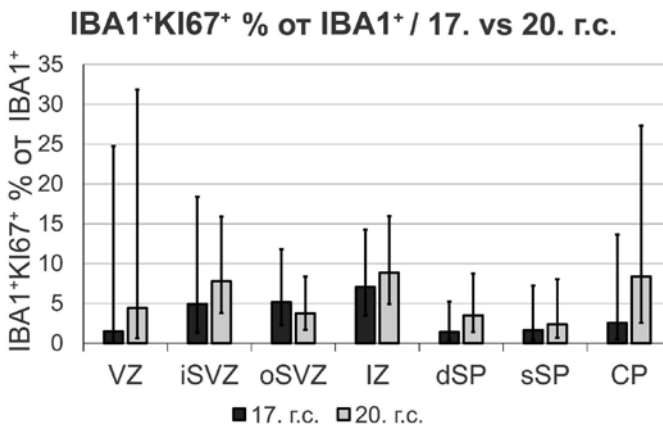
5.3.3. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.

Процентните стойности на IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки бяха сравнени в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с. (табл. 5.15. и фиг. 5.25.). Няма статистически значима разлика между 20. и 17. г.с. при никоя от изследваните герминативни зони.

Табл. 5.15. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

Сравнение на % IBA1 ⁺ KI67 ⁺ от IBA1 ⁺ между 20. и 17. г.с.			
Зона	Отношение 20/17	CI	p
VZ	2,92	0.30 – 28.21	0,3546
iSVZ	1,58	0.43 – 5.76	0,4911
oSVZ	0,72	0.25 – 2.10	0,5534
IZ	1,26	0.55 – 2.90	0,5882
dSP	2,50	0.71 – 8.74	0,1524
sSP	1,44	0.34 – 6.07	0,6198
CP	3,25	0.67 – 15.79	0,1431

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.25. Сравнение на процента IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.4. Анализ на SOX2⁺ клетки в палиума

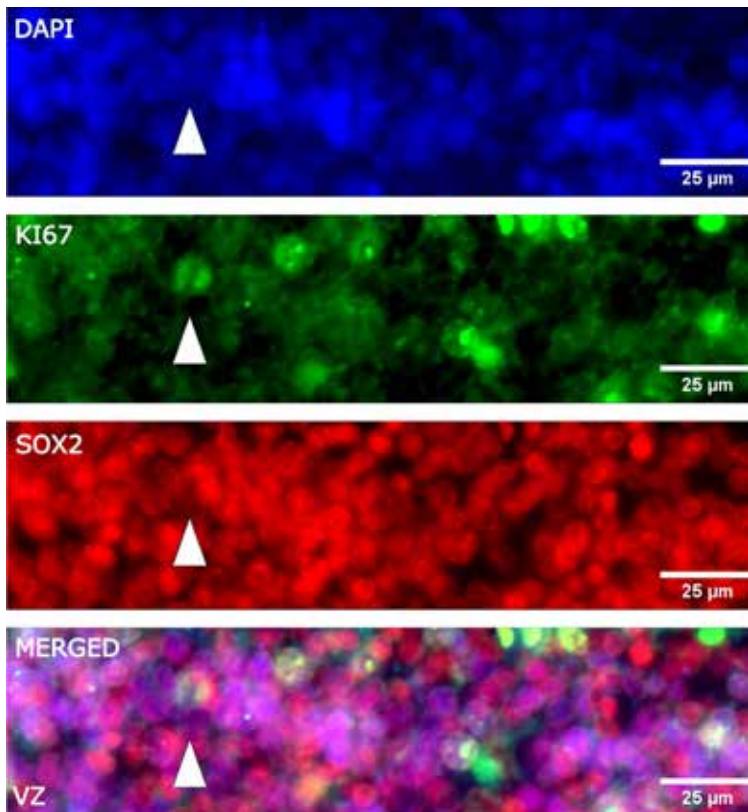
5.4.1. Анализ на SOX2⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

Процент на SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

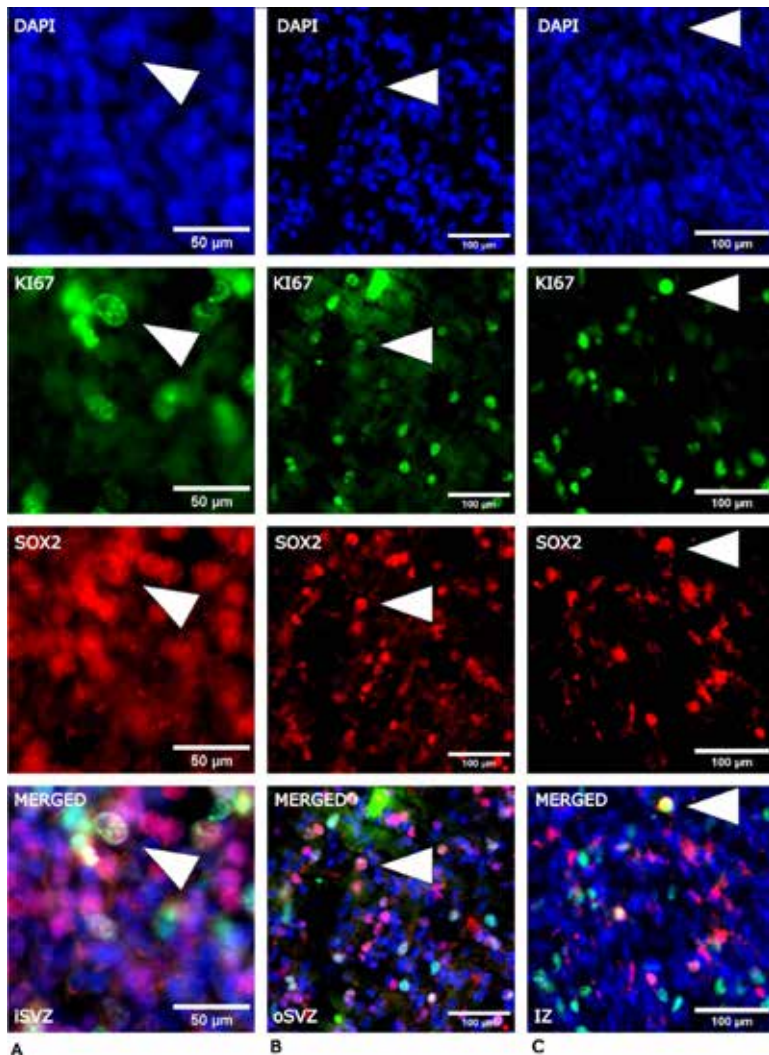
Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с. (табл. 5.16.; фиг. 5.26., 5.27. и 5.28.).

Табл. 5.16. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с.

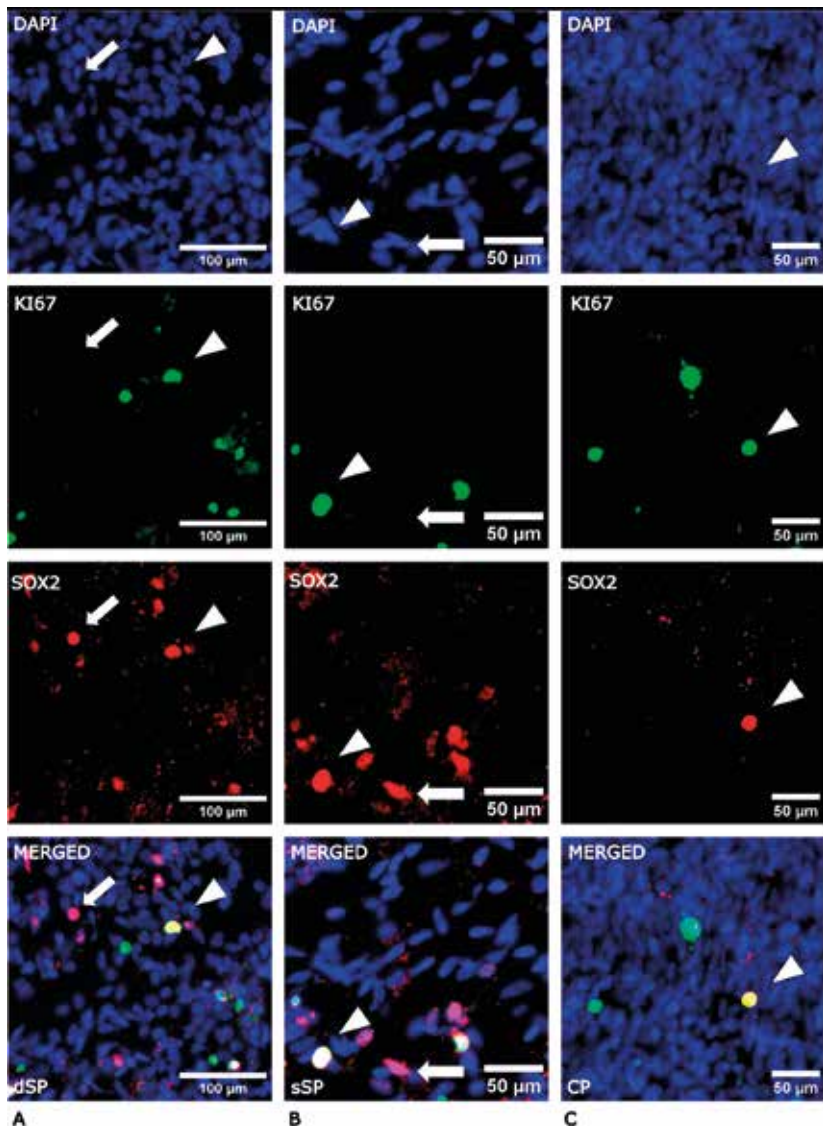
Процент на SOX2 ⁺ от DAPI през 17. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	85,67	65.49 – 112.07
iSVZ	80,44	61.32 – 105.53
oSVZ	44,46	33.21 – 59.53
IZ	37,63	28.01 – 50.55
dSP	7,99	5.30 – 12.05
sSP	1,46	0.70 – 3.07



Фиг. 5.26. SOX2 и KI67 във VZ на палиума през 17. г.с.
Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки



Фиг. 5.27. SOX2 и KI67 в герминативните зони на палиума през 17. г.с.
 Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки
 А. iSVZ; В. oSVZ; С. IZ



Фиг. 5.28. SOX2 и KI67 в герминативните зони на палиума през 17. г.с.
Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки;
дълга стрелка: SOX2⁺KI67⁻ клетки
A. dSP; B. sSP; C. CP

Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 17. г.с.

Не установихме статистически значима разлика между VZ и iSVZ (табл. 5.17. и фиг. 5.29.А.), но такава е налице между VZ и oSVZ, като VZ съдържа 1,93 пъти повече клетки от oSVZ (CI: 1,13 – 3,28; $p < 0.01$). iSVZ съдържа 1,81 пъти повече SOX2⁺ клетки от oSVZ (CI: 1,06 – 3,09; $p = 0.02$).

Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 17. г.с.

Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. Не установихме статистически значима разлика при сравнение на oSVZ с IZ (табл. 5.17. и фиг. 5.29.В.), но такава е налице при всички останали двойки съседни зони на палиума. Процентът на SOX2⁺ клетки от DAPI в IZ е 4,71 пъти по-голям спрямо dSP (CI: 2,37 – 9,35; $p < 0.0001$) и 5,47 пъти по-голям в dSP спрямо sSP (CI: 1,67 – 17,88; $p = 0.0007$).

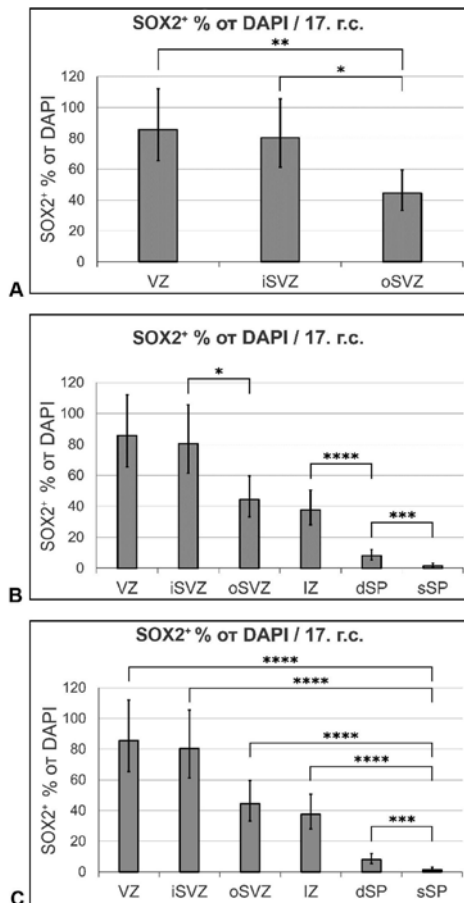
Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо sSP през 17. г.с.

Установихме статистически значими разлики в процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки при сравнение на всяка герминативна зона със sSP (табл. 5.17. и фиг. 5.29.С.). Спрямо sSP този процент е по-голям 58,61 пъти във VZ (CI: 19,38 – 177,26; $p < 0.0001$), 55,03 пъти в iSVZ (CI: 18,16 – 166,83; $p < 0.0001$), 30,42 пъти в oSVZ (CI: 9,93 – 93,17; $p < 0.0001$), 25,74 пъти в IZ (CI: 8,41 – 78,80; $p < 0.0001$) и както вече бе описано в предната точка, 5,47 пъти в dSP (CI: 1,67 – 17,88; $p = 0.0007$).

Табл. 5.17. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Сравнение на % SOX2⁺ от DAPI между зоните през 17. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	1,06	0.64 – 1.77	0,9993
VZ / oSVZ	1,93	1.13 – 3.28	0,0062**
iSVZ / oSVZ	1,81	1.06 – 3.09	0,0205*
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,18	0,68 – 2,07	0,9563
IZ / dSP	4,71	2,37 – 9,35	<0,0001****
dSP / sSP	5,47	1,67 – 17,88	0,0007***
Сравнение между всяка зона спрямо sSP:			
VZ / sSP	58,61	19,38 – 177,26	<0,0001****
iSVZ / sSP	55,03	18,16 – 166,83	<0,0001****
oSVZ / sSP	30,42	9,93 – 93,17	<0,0001****
IZ / sSP	25,74	8,41 – 78,80	<0,0001****
dSP / sSP	5,47	1,67 – 17,88	0,0007***

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.29. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

А. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ;

В. Сравнение между съседните зони;

С. Сравнение между всяка зона спрямо CP

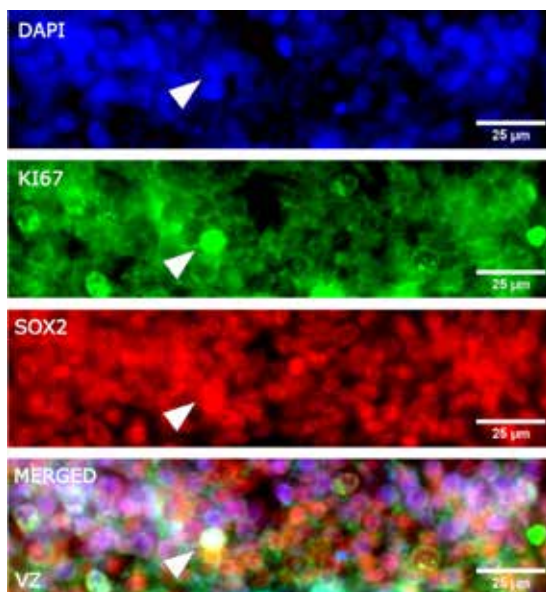
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5.4.2. Анализ на SOX2⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

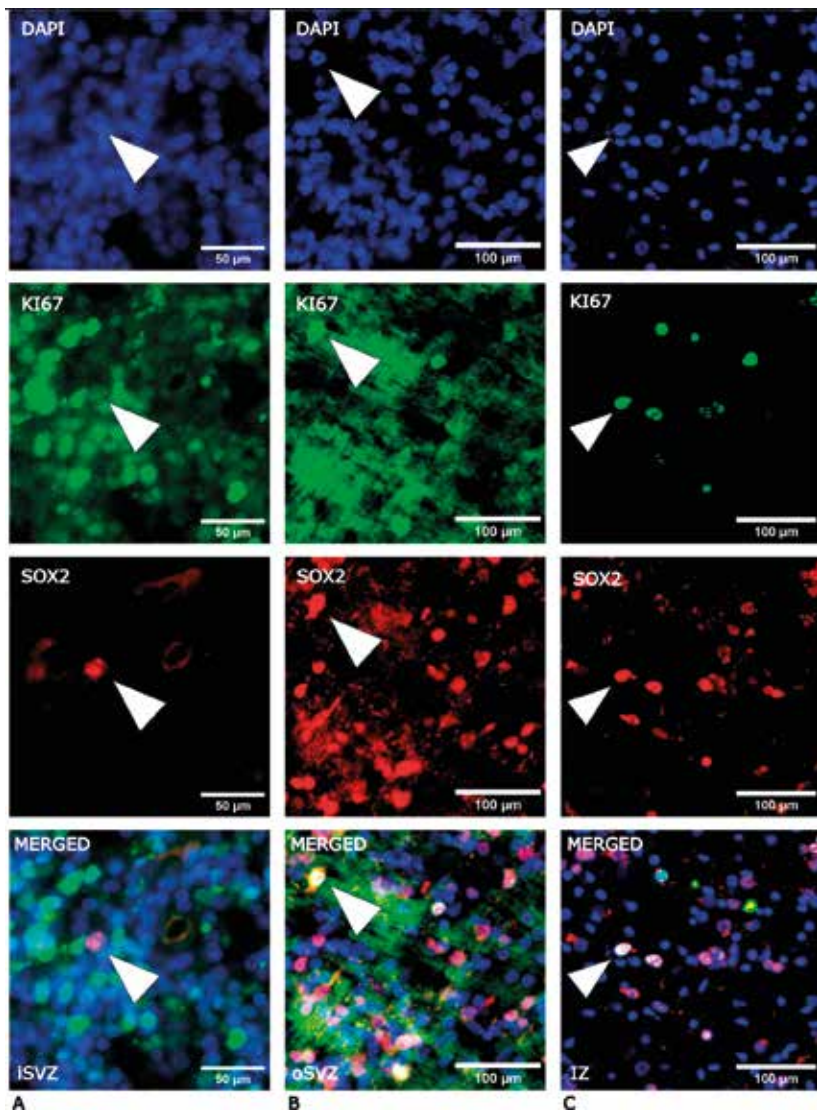
Процент на SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в палиума през 20. г.с. Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с. Поради оскъдността на изследваните клетки в СР сме представили данни до sSP включително (табл. 5.18.; фиг. 5.30., 5.31. и 5.32.).

Табл. 5.18. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

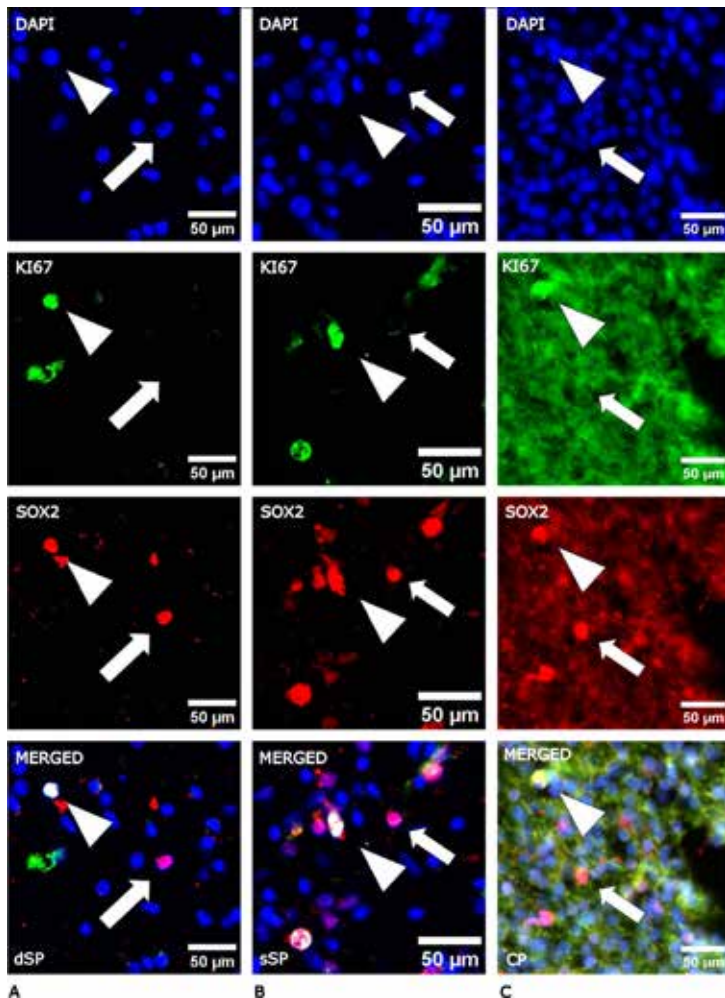
Процент на SOX2 ⁺ от DAPI през 20. г.с.		
Зона	Маргинални средни	СІ
VZ	67,73	53.29 – 86.09
iSVZ	67,82	53.31 – 86.28
oSVZ	35,85	27.55 – 46.66
IZ	52,35	40.75 – 67.26
dSP	18,35	13.34 – 25.23
sSP	3,31	1.82 – 6.02



Фиг. 5.30. SOX2 и KI67 във VZ на палиума през 20. г.с.
Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки



Фиг. 5.31. SOX2 и KI67 в герминативните зони на палиума през 20. г.с.
 Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки А. iSVZ; В. oSVZ; С. IZ



Фиг. 5.32. SOX2 и KI67 в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Къса стрелка: SOX2⁺KI67⁺ клетки. **A.** dSP; **B.** sSP; **C.** CP

Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 20. г.с.:

Не се установи статистически значима разлика между VZ и iSVZ (табл. 5.19. и фиг. 5.33.A), но такава е налице между VZ и oSVZ, като

VZ съдържа 1,89 пъти по-голям процент от изследваните клетки спрямо oSVZ (CI: 1,16 – 3,09; $p < 0.01$). Процентът в iSVZ е 1,89 пъти по-голям спрямо oSVZ (CI: 1,15 – 3,10; $p < 0.01$).

Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 20. г.с. Сравненията между съседните VZ, iSVZ и oSVZ са описани в предната точка. От останалите двойки съседни зони не установихме статистически значима разлика единствено между oSVZ и IZ (табл. 5.19. и фиг. 5.33.В.). IZ съдържа 2,85 пъти по-голям процент SOX2⁺ клетки от dSP (CI: 1,61 – 5,05; $p < 0.0001$), а dSP – 5,54 пъти повече спрямо sSP (CI: 2,10 – 14,60; $p < 0.0001$).

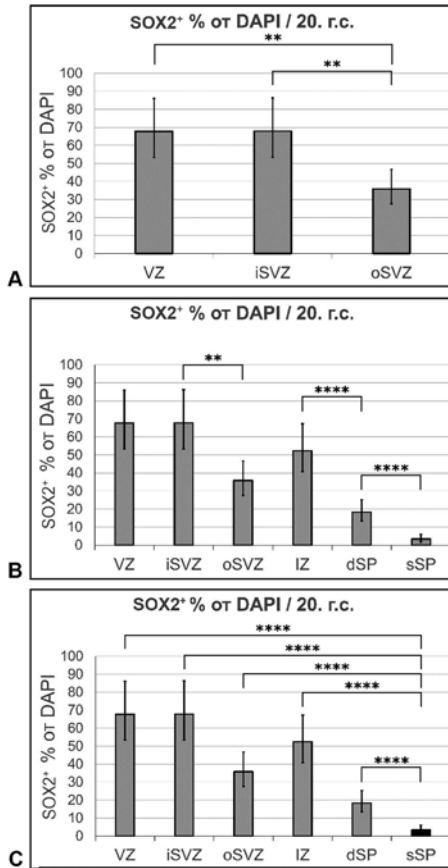
Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо sSP през 20. г.с.

Анализът на данните показва статистически-значима разлика между всички зони спрямо sSP (табл. 5.19. и фиг. 5.33.С), като процентът SOX2⁺ клетки е 20,44 пъти по-висок във VZ (CI: 8,16 – 51,23; $p < 0.0001$), 20,47 в iSVZ (CI: 8,16 – 51,34; $p < 0.0001$), 10,82 в oSVZ (CI: 4,26 – 27,48; $p < 0.0001$), 15,8 в IZ (CI: 6,26 – 39,87; $p < 0.0001$) и, както бе описано в предната точка, 5,54 в sSP (CI: 2,10 – 14,60; $p < 0.0001$).

Табл. 5.19. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Сравнение на % SOX2⁺ от DAPI между зоните през 20. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	1,00	0,63 – 1,59	0,9999
VZ / oSVZ	1,89	1,16 – 3,09	0,0033**
iSVZ / oSVZ	1,89	1,15 – 3,10	0,0034**
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	0,68	0,41 – 1,13	0,2661
IZ / dSP	2,85	1,61 – 5,05	<0,0001****
dSP / sSP	5,54	2,10 – 14,60	<0,0001****
Сравнение между всяка зона спрямо sSP:			
VZ / sSP	20,44	8,16 – 51,23	<0,0001****
iSVZ / sSP	20,47	8,16 – 51,34	<0,0001****
oSVZ / sSP	10,82	4,26 – 27,48	<0,0001****
IZ / sSP	15,80	6,26 – 39,87	<0,0001****
dSP / sSP	5,54	2,10 – 14,60	<0,0001

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Фиг. 5.33. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

А. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ; **В.** Сравнение между съседните зони; **С.** Сравнение между всяка зона спрямо СР
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5.4.3. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.

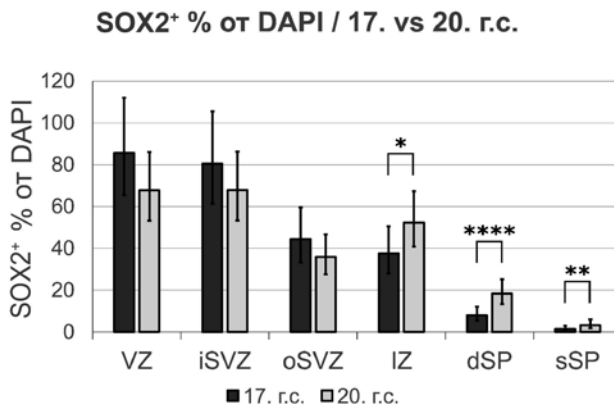
Процентните стойности на SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки бяха сравнени в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с. (табл. 5.20. и фиг. 5.34.).

Анализът на данните не установи статистически значима разлика при сравнение на VZ, iSVZ и oSVZ между двете седмици, но такава е налице при останалите зони. IZ на 20. г.с. съдържа 1,39 пъти по-голям процент SOX2⁺ клетки спрямо IZ на 17. г.с. (CI: 1,02 – 1,90; p = 0,04). При dSP, 20. г.с. – 2,3 пъти по-голям спрямо 17. г.с. (CI: 1,55 – 3,39; p < 0.0001); при sSP, 20. г.с. – 2,27 пъти по-голям спрямо 17.г.с. (CI: 1,23 – 4,18; p < 0,01).

Табл. 5.20. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

Сравнение на % SOX2 ⁺ от DAPI между 20. и 17. г.с.			
Зона	Отношение 20/17	CI	p
VZ	0,79	0.59 – 1.06	0,1134
iSVZ	0,84	0.63 – 1.13	0,2574
oSVZ	0,81	0.59 – 1.10	0,1759
IZ	1,39	1.02 – 1.90	0,0364*
dSP	2,30	1.55 – 3.39	< 0,0001****
sSP	2,27	1.23 – 4.18	0,0089**

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.34. Сравнение на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.5. Анализ на SOX2⁺KI67⁺ клетки в палиума

5.5.1. Анализ на SOX2⁺KI67⁺ клетки в палиума през 17. г.с.

Процент на SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в палиума през 17. г.с. Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с. Поради ниската гъстота на изследваните клетки в по-повърхностните зони сме представили данни до dSP, включително (табл. 5.21.; фиг. 5.26., 5.27. и 5.28.).

Табл. 5.21. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Процент на SOX2 ⁺ KI67 ⁺ от SOX2 ⁺ през 17. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	25,38	16.23 – 39.71
iSVZ	8,11	4.48 – 14.69
oSVZ	40,65	25.87 – 63.86
IZ	36,72	23.11 – 58.35
dSP	4,62	0.61 – 34.96

Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 17. г.с.:

VZ съдържа 3,13 пъти повече от изследваните клетки спрямо iSVZ (CI: 1,18 – 8,33; $p = 0.01$), но няма сигнификантна разлика с oSVZ. iSVZ съдържа пет пъти по-малък процент SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки спрямо oSVZ (CI: 0,07 – 0,53; $p = 0.0001$). Виж табл. 5.22. и фиг. 5.35.A.

Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 17. г.с.

Не установихме статистически значима разлика нито при двойката oSVZ/IZ, нито при IZ/dSP (табл. 5.22. и фиг. 5.35.B).

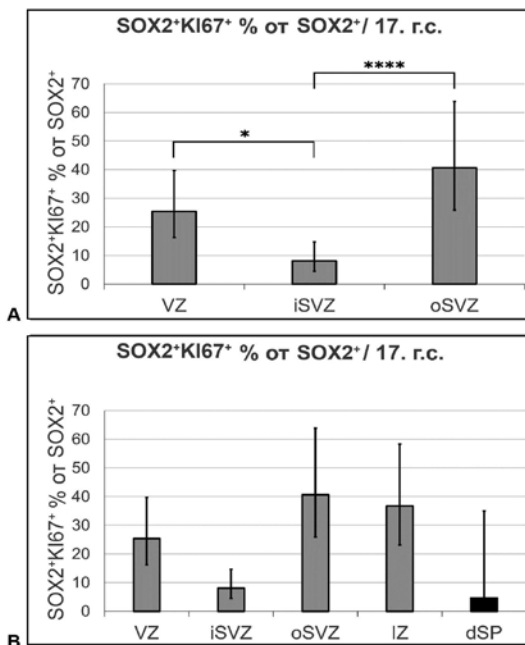
Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо dSP през 17. г.с.

Анализът на данните показва, че няма статистически значима разлика в процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между никоя от изследваните зони спрямо dSP (табл. 5.22. и фиг. 5.35.В).

Табл. 5.22. Сравнения на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

Сравнение на % SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ между зоните през 17. г.с.			
Зони	Отношение	СІ	р
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	3,13	1.18 – 8.33	0,0134
VZ / oSVZ	0,62	0.27 – 1.42	0,5118
iSVZ / oSVZ	0,20	0.07 – 0.53	0,0001
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	1,11	0.48 – 2.55	0,9972
IZ / dSP	7,94	0.48 – 131.63	0,2549
Сравнение между всяка зона спрямо dSP:			
VZ / dSP	5,49	0,33 – 90,78	0,4541
iSVZ / dSP	1,75	0,10 – 30,50	0,9828
oSVZ / dSP	8,79	0,53 – 145,25	0,2099
IZ / dSP	7,94	0,48 – 131,63	0,2549

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.35. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 17. г.с.

А. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ;

В. Сравнение между всяка зона с CP

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.5.2. Анализ на SOX2⁺KI67⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

Процент на SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в палиума през 20. г.с.

Изчислихме маргиналните средни стойности с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с. Поради ниската гъстота на изследваните клетки в по-повърхностните зони сме представили данни до dSP, включително (табл. 5.23.; фиг. 5.30., 5.31. и 5.32.).

Табл. 5.23. Маргинални средни с интервалите им на доверителност на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Процент на SOX2 ⁺ KI67 ⁺ от SOX2 ⁺ през 20. г.с.		
Зона	Маргинални средни	CI
VZ	5,92	3.50 – 10.02
iSVZ	1,93	0.95 – 3.92
oSVZ	14,98	9.09 – 24.68
IZ	30,12	20.03 – 45.28
dSP	0,71	0.09 – 5.63

Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между VZ, iSVZ и oSVZ на палиума по двойки през 20. г.с.

Открихме статистически значими разлики при сравнение на всяка двойка от анализирани зони с останали две (табл. 5.24. и фиг. 5.36.А). VZ съдържа 3,07 пъти повече от изследваните клетки спрямо iSVZ (CI: 1,03 – 9,14; p=0,04), но 2,5 пъти по-малко от oSVZ (отношение: 0,40; CI: 0,16 – 0,97; p = 0,04). iSVZ съдържа 7,69 пъти по-малък процент SOX2⁺Ki67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки спрямо oSVZ (отношение: 0,13; CI: 0,04 – 0,38; p < 0,0001).

Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между съседните герминативни зони на палиума по двойки през 20. г.с.

Статистически значима разлика открихме (табл. 5.24. и фиг. 5.36.В) единствено при сравняване на IZ с dSP, като IZ съдържа 42,63 пъти повече от изследваните клетки (CI: 2,43 – 747,69; p = 0,03).

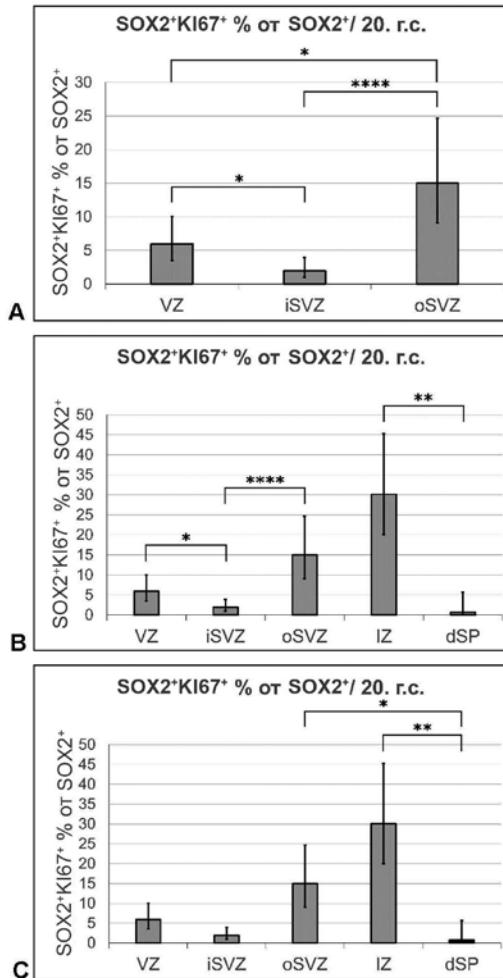
Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между всяка герминативна зона спрямо dSP през 20. г.с.

Спрямо dSP oSVZ съдържа 21,21 пъти повече от изследваните клетки (CI: 1,20 – 375,82; p = 0,03), а IZ – 42,63 пъти повече (CI: 2,43 – 747,69; p = 0,03). Няма статистически значима разлика при сравняване на останалите зони с dSP (табл. 5.24. и фиг. 5.36.С).

Табл. 5.24. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

Сравнение на % SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ между зоните през 20. г.с.			
Зони	Отношение	CI	p
Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ:			
VZ / iSVZ	3,07	1,03 – 9,14	0,0402
VZ / oSVZ	0,40	0,16 – 0,97	0,0388
iSVZ / oSVZ	0,13	0,04 – 0,38	<0,0001
Сравнение между другите съседни зони:			
oSVZ / IZ	0,50	0,22 – 1,14	0,1453
IZ / dSP	42,63	2,43 – 747,69	0,0034
Сравнение между всяка зона спрямо dSP:			
VZ / dSP	8,38	0,47 – 149,41	0,2541
iSVZ / dSP	2,73	0,14 – 51,44	0,8803
oSVZ / dSP	21,21	1,20 – 375,82	0,0312
IZ / dSP	42,63	2,43 – 747,69	0,0034

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Фиг. 5.36. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между герминативните зони на палиума през 20. г.с.

А. Сравнение между VZ, iSVZ и oSVZ;

В. Сравнение между съседните зони;

Сравнение между всяка зона спрямо CP

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.5.3. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с.

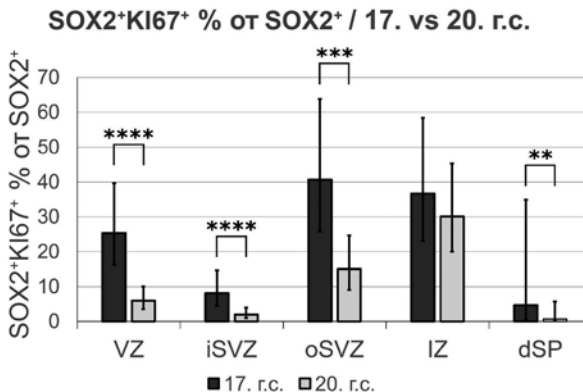
Процентните стойности на SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки в бяха сравнени в аналогичните зони на палиума между 20. и 17. г.с. (табл. 5.25. и фиг. 5.37.).

VZ на 20. г.с. съдържа приблизително 4,35 пъти по-малко от изследваните клетки спрямо VZ на 17. г.с. (отношение: 0,23; CI: 0.13 – 0.41; $p < 0.0001$). iSVZ на 20. г.с. съдържа приблизително 4,17 пъти по-малко от изследваните клетки спрямо iSVZ на 17. г.с. (отношение: 0,24; CI: 0.13 – 0.44; $p < 0.0001$). oSVZ на 20. г.с. съдържа приблизително 2,7 пъти по-малко от изследваните клетки спрямо oSVZ на 17. г.с. (отношение: 0,37; CI: 0.21 – 0.64; $p = 0,0004$). Няма статистически значима разлика при сравнение на аналогичните IZ. dSP на 20. г.с. съдържа приблизително 6,67 пъти по-малко от изследваните клетки спрямо dDP на 17. г.с. (отношение: 0,15; CI: 0.05 – 0.48; $p = 0,0012$).

Табл. 5.25. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

Сравнение на % SOX2 ⁺ KI67 ⁺ от SOX2 ⁺ между 20. и 17. г.с.			
Зона	Отношение 20/17	CI	p
VZ	0,23	0.13 – 0.41	<0.0001****
iSVZ	0,24	0.13 – 0.44	<0.0001****
oSVZ	0,37	0.21 – 0.64	0.0004***
IZ	0,82	0.48 – 1.41	0.4750
dSP	0,15	0.05 – 0.48	0.0012**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Фиг. 5.37. Сравнение на процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки между аналогичните зони на 20. и 17. г.с.

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

5.6. Корелации между микроглия и прогенитори

Анализирахме отношението между микроглия и прогенитори. За целта изчислихме корелации по Spearman, за да установим посоката, силата и статистическата значимост на отношенията между всеки от изследваните микроглиални маркери спрямо всеки от маркерите за прогенитори.

Проведохме анализа на няколко нива на групиране на данните: по седмица и регион; по регион и зона; по седмица, регион и зона. Регион при всички сравнения отговаря на палиум.

При групиране по седмица и регион се сумират данните от всички герминативни зони за дадена седмица. По този начин търсим корелации между микроглия и прогенитори глобално в целия палиум взет като цяло, без разбивка по зони.

При групиране по регион и зона се сумират данните от двата времеви периода (17. и 20. г.с.) при налична разбивка по зони. Това позволява да търсим корелации в дадена зона в рамките на разширен сумарен времеви период.

При групиране по седмица, регион и зона постигаме най-подробна разбивка, позволяваща да търсим корелации между микроглия и прогенитори в конкретна зона на палиума в конкретна седмица.

Дотук получените данни от всички микроглиални маркери бяха корелирани с тези от всички маркери за прогенитори. По този начин получаваме следните двойки корелирани променливи:

1. Гъстота на IBA1⁺ клетки на mm² с процент SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки
2. Гъстота на IBA1⁺ клетки на mm² с процент SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки
3. Процент IBA1⁺НАМ56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки с процент SOX2⁺ клетки от всички DAPI⁺ клетки
4. Процент IBA1⁺НАМ56⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки с процент SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки
5. Процент IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки с процент SOX2⁺клетки от всички DAPI⁺ клетки
6. Процент IBA1⁺KI67⁺ клетки от всички IBA1⁺ клетки с процент SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки

Поради липса на вариране (variance = 0) на места не може да се изчисли ковариация, следователно сме представили само възможните изчислими корелации.

5.6.1. Корелации между микроглия и прогенитори по седмица и регион

Корелации между микроглия и прогенитори в целия палиум през 17. г.с.

Анализът на данните показва статистически значима корелация между гъстотата на IBA1⁺ клетки на mm² с двата маркера за прогенитори: с процент SOX2⁺ от DAPI (rho = 0,85; p < 0,0001) и с процент SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ (rho = 0,52; p = 0,02). Не установихме статистически значими корелации при анализ на другите двойки променливи (фиг. 5.38.).

Корелации между микроглия и прогенитори в целия палиум през 20. г.с.

Установихме статистически значима корелация между гъстотата на IBA1⁺ клетки на mm² процент SOX2⁺ от DAPI (rho = 0,81; p < 0,0001), както и между процент IBA1⁺НАМ56⁺ от IBA1⁺ с процент SOX2⁺ от DAPI (rho = 0,55; p < 0.01). Не установихме статистически значими корелации при анализ на другите двойки променливи (фиг. 5.38.).

Палиум / 17. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,85	0,52
	p	★ <0,001	★ 0,02
HAM56% от IBA1	rho	0,15	0,17
	p	0,51	0,45
KI67% от IBA1	rho	0,11	0,648
	p	0,24	0,29

Палиум / 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,81	-0,079
	p	★ <0,001	0,68
HAM56% от IBA1	rho	0,55	0,13
	p	★ 0,002	0,48
KI67% от IBA1	rho	0,3	0,11
	p	0,11	0,55

Фиг. 5.38. Корелации между микроглия и прогенитори в целия палиум през 17. и 20. г.с.

Червено: позитивни корелации; **синьо:** негативни корелации.

Звезда: статистически значима стойност на p

5.6.2. Корелации между микроглия и прогенитори в отделните зони на палиума сумарно за 17. и 20. г.с.

Установихме статистически значими корелации между процент IBA1⁺HAM56⁺ от всички IBA1⁺ с процент SOX2⁺KI67⁺ от всички SOX2⁺ за следните зони: VZ (rho = -0,77; p = 0,03), oSVZ (rho = -0,78; p = 0,03), IZ (rho = -0,78; p = 0,03), dSp (rho = -0,73; p = 0,04). Не установихме статистически значими корелации между изследваните променливи в никоя от зоните на палиума (**фиг. 5.39.**).

VZ / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	-0,63	-0,93
	p	0,10	☆ p<0,001
HAM56% от IBA1	rho	-0,43	-0,77
	p	0,28	☆ 0,03
KI67% от IBA1	rho	-0,12	-0,23
	p	0,78	0,59

ISVZ / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	-0,29	-0,74
	p	0,49	☆ 0,04
HAM56% от IBA1	rho	-0,6	-0,41
	p	0,12	0,31
KI67% от IBA1	rho	-0,097	-0,11
	p	0,82	0,80

oSVZ / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	-0,26	-0,67
	p	0,53	0,07
HAM56% от IBA1	rho	-0,47	-0,78
	p	0,24	☆ 0,02
KI67% от IBA1	rho	0,19	0,5
	p	0,65	0,20

IZ / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,57	-0,36
	p	0,14	0,38
HAM56% от IBA1	rho	0,28	-0,78
	p	0,51	☆ 0,02
KI67% от IBA1	rho	-0,048	0,41
	p	0,91	0,32

dSP / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,69	0,2
	p	0,06	0,63
HAM56% от IBA1	rho	0,14	-0,73
	p	0,75	☆ 0,04
KI67% от IBA1	rho	-0,02	-0,53
	p	0,96	0,18

sSP / 17. + 20. г.с.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,21	NA
	p	0,62	NA
HAM56% от IBA1	rho	-0,0065	NA
	p	0,99	NA
KI67% от IBA1	rho	-0,11	NA
	p	0,80	NA

Фиг. 5.39. Корелации между микроглия и прогенитори в отделните зони на палиума сумарно за 17. и 20. г.с. **Червено:** позитивни корелации; **синьо:** негативни корелации; **NA** = липса на изчислена корелация; **Звезда:** статистически значима стойност на p

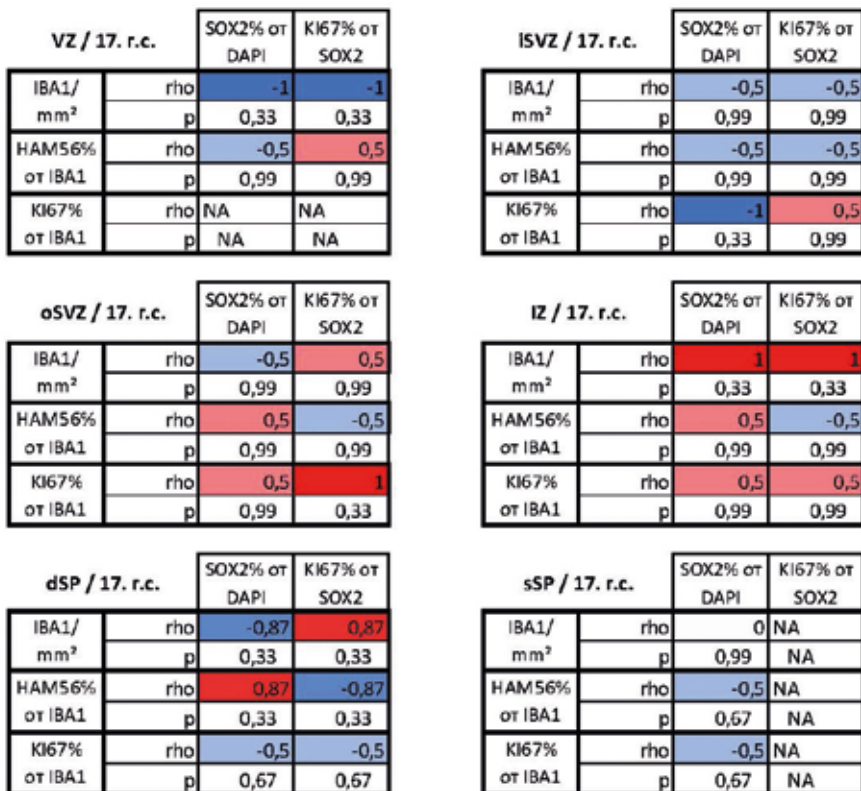
5.6.3. Корелации между микроглия и прогенитори по седмица, регион и зона

Анализът на данните показва следните статистически значими негативни корелации: в dSP на 20. г.с. между процента IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ с процента SOX2⁺ от DAPI (rho = -0,89; p = 0,04); в oSVZ на 20. г.с. между процента IBA1⁺KI67⁺ от IBA1⁺ с процента SOX2⁺ от DAPI (rho = -0,97; p = 0,0048).

В IZ на 20. г.с. установихме и две корелации с гранична статистическа значимост (p < 0,1): между процента IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ с

процента SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ ($\rho = -0,87$; $p = 0,0539$), както и между процента IBA1⁺KI67⁺ от IBA1⁺ с процента SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ ($\rho = 0,82$; $p = 0,0886$).

Не установихме статистически значими корелации между изследваните променливи в никоя от другите зони на палиума и при 17. и при 20. г.с. (фиг. 5.40. и 5.41.).



Фиг. 5.40. Корелации между микроглия и прогенитори в отделните герминативни зони на палиума през 17. г.с.

Червено: позитивни корелации; **синьо:** негативни корелации. **NA** = липса на изчислена корелация. **Звезда:** статистически значима стойност на p

VZ / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,21	-0,72
	p	0,74	0,17
HAM56% от IBA1	rho	0,31	-0,31
	p	0,61	0,61
KI67% от IBA1	rho	0,29	0,29
	p	0,64	0,64

iSVZ / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	-0,051	NA
	p	0,94	NA
HAM56% от IBA1	rho	-0,21	NA
	p	0,74	NA
KI67% от IBA1	rho	0,67	NA
	p	0,22	NA

oSVZ / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,62	-0,21
	p	0,27	0,74
HAM56% от IBA1	rho	0,36	-0,36
	p	0,55	0,55
KI67% от IBA1	rho	-0,97	-0,36
	p	★ 0,005	0,55

IZ / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,67	-0,46
	p	0,22	0,43
HAM56% от IBA1	rho	0,67	-0,87
	p	0,22	0,05
KI67% от IBA1	rho	-0,1	0,82
	p	0,87	0,09

dSP / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	0,45	0,35
	p	0,45	0,56
HAM56% от IBA1	rho	-0,89	-0,71
	p	★ 0,04	0,18
KI67% от IBA1	rho	-0,57	-0,54
	p	0,31	0,34

sSP / 20. r.c.		SOX2% от DAPI	KI67% от SOX2
IBA1/ mm ²	rho	-0,34	NA
	p	0,58	NA
HAM56% от IBA1	rho	-0,34	NA
	p	0,57	NA
KI67% от IBA1	rho	-0,12	NA
	p	0,84	NA

Фиг. 5.41. Корелации между микроглия и прогенитори в отделните герминативни зони на палиума през 20. г.с.

Червено: позитивни корелации; **синьо:** негативни корелации.

NA = липса на изчислена корелация.

Звезда: статистически значима стойност на p

6. ДИСКУСИЯ

6.1. Обяснение и обосновка на използвания модел при проучването

6.1.1. Резюме на модела

Настоящото проучване изпълни следното:

1. Анализира количествено три маркера при микроглия (IBA1, HAM56 и KI67) в герминативните зони на палиума през 17. и 20. седмица.
2. Анализира количествено два маркера при невроналните прогенитори (SOX2 и KI67) в същите зони и времеви периоди.
3. Корелира получените данни за микроглия и прогенитори с цел откриване на отношения между двете по време на развитието.

Количествените данни за всеки отделен маркер бяха сравнени по следните начини:

1. Три типа сравнения между зоните на палиума през дадена седмица: (1) трите основни пролиферативни (VZ, iSVZ, oSVZ) бяха сравнени всяка със всяка, (2) всяка зона беше сравнена със съседната ѝ и (3) всяка с CP.
2. Аналогични зони бяха сравнени между двата времеви периода (VZ на 17. г.с. с VZ на 20. г.с. и т.н.).

Корелации се извършиха между всеки микроглиален маркер с всеки маркер за прогенитори.

Използвахме два различни маркера за микроглия (IBA1 и HAM56) поради причината, че IBA1 е универсален маркер, маркиращ цялата микроглия (Ito et al. 1998), а HAM56 е маркер за активация на микроглия към фагоцитарен фенотип (Tonchev et al. 2003). По този начин използването на два маркера ни позволява да изследваме два фенотипа на микроглия: IBA1⁺HAM56⁻ (неактивирана) и IBA1⁺HAM56⁺ (активирана).

Един от най-често използваните маркери за визуализиране на активирана фагоцитираща микроглия, CD68, е с основен недостатък, че маркира всички микроглиални клетки (Hendrickx et al. 2017). За разлика от него HAM56 маркира само част от цялата микроглия (Tonchev et al. 2003), като по този начин ни позволява много по-прецизно да проучим нейните субпопулации, съответно специфичното им отношение към невrogenезата.

6.1.2. Обосновка за избора на конкретните два времеви периода

Счита се, че основната (макар и не цяла) част от неврогенезата при човек се извършва преди 20. г.с. (Penna et al. 2021). Следователно 20. г.с. е много удобен времеви период за изследване, тъй като едновременно очакваме затихнала неврогенеза и достатъчна близост „до ръба“ на неврогенния период, за да можем да я съпоставим с него. Изборът на по-късна седмица от 20. г.с. би внесло прекалено много други променливи, предвид преобладаването на други процеси на по-късните етапи. Избрахме 17. г.с. като период за „активна“ неврогенеза, тъй като е в златната среда между отдалеченост и близост до 20. г.с. – макар да очакваме разлика по отношение на активността на прогениторите, то размерите на мозъка и развитието на герминативните зони през двата времеви периода са сходни и съпоставими.

6.1.3. Обосновка за избора на сравнения

Проучванията, показващи причинно-следствени връзки между микроглия и прогенитори, използват експерименти при животни, при които се извършва фармакологична или генетична модулация на микроглията и се анализират ефектите върху популациите прогенитори. Поради невъзможността за извършване на експеримент, съответно показване на директни причинно-следствени връзки при човек, се налага да се работи единствено със сравнения и корелации. Следователно това налага правилен и прецизен подбор на избраните сравнения и корелации, за да могат резултатите да опишат една последователна картина, която да бъде интерпретирана в логичен контекст.

Всеки отделен маркер първо беше околичествен в герминативните зони на палиума за всеки времеви период. Включените зони са VZ, iSVZ, oSVZ, IZ, dSP, sSP и CP. Не включихме MZ към проучването поради изключителната рядкост на изследваните маркери в нея.

За настоящото проучване решихме да разделим SP на дълбока (dSP) и повърхностна (sSP) част. Такова разделение на тази зона е налично, макар и рядко из литературата, и е базирано на нейната морфология по отношение на развиващите се неврони и прогенитори (Kostović, Išasegi, and Krsnik 2019).

Нашият избор за разделянето ѝ беше продиктуван от изключително интересното нехомогенно разпределение на микроглията в нея през 20. г.с., при която ясно личи още от обзорното изображение по-голямата гъстота на IBA1⁺ в dSP (фиг. 5.3.).

Предвид изследваните хипотези за отношения между микроглия и прогенитори разделянето на SP на dSP и sSP беше логичен избор.

Околичествените данни за всеки маркер първо бяха сравнени между зоните в рамките на всеки времеви период.

Първият тип сравнения е между трите основни пролиферативни зони (VZ, iSVZ, oSVZ), като всяка беше сравнена с всяка, получавайки следните двойки сравнения: VZ/iSVZ, VZ/oSVZ, iSVZ/oSVZ. Тези зони са ключови за неврогенезата, затова и там очакваме най-важните резултати.

Вторият тип сравнения е между всяка зона със съседната ѝ. Получаваме следните двойки сравнения: VZ/iSVZ, iSVZ/oSVZ, oSVZ/IZ, IZ/dSP, dSP/sSP, sSP/CP. По този начин търсим статистически значим градиент на промяна на изследвания маркер. Това е особено важно да се види при сравненията между oSVZ и IZ, тъй като първата е ключова неврогенна, а втората – не, както и между dSP и sSP, както вече обяснихме.

Третият тип сравнения е между всяка зона спрямо CP. CP е най-дорзалната зона, при която можем да получим адекватни количествени измервания на микроглиалните маркери. Тази зона е финална локализация на постмигранторните неврони, които са в процес на диференциране, формирайки бъдещите слоеве на неокортекса. Тези особености на CP я правят, по отношение на неврогенезата, идеална „нула“, с която да сравняваме пролиферативните зони с активна неврогенеза.

Поради ниската плътност на маркерите за прогенитори (SOX2⁺ и SOX2⁺KI67⁺ клетки) в повърхностните слоеве на палиума, анализът беше извършен до най-високото ниво, при което могат да се получат надеждни количествени измервания. Ето защо не сме включили MZ в изследването, а маркерите за прогенитори бяха възможни да бъдат измерени количествено до dSP или sSP. Съответно най-дорзалната измерена зона определя и максималното ниво, при което можем да търсим корелации.

При подбора на тези три типа сравнения се получава припокриване. Например при сравнение на VZ, iSVZ и oSVZ помежду им получа-

ваме първите два резултата при сравнение на съседни зони: VZ/iSVZ и iSVZ/oSVZ. Последното сравнение при съседни зони, например sSP/CP е също и последното сравнение между всяка зона спрямо CP. Важно е да отбележим, че това не са отделни измервания или сравнения, а неизбежна тавтология. При описанието на резултатите целяхме да я избегнем, но сме я оставили, където е необходимо, за по-голяма прегледност.

Четвъртият тип сравнения е между стойностите на един и същ маркер между аналогични зони на двата времеви периода, например гъстотата на IBA1⁺ клетки във VZ на 20. г.с. се сравнява с гъстотата на IBA1⁺ клетки във VZ на 17. г.с. Изборът да опише сравнението от 20. към 17. г.с., а не обратното се продиктува от значително по-голямото количество на повечето от изследваните маркери през 20. отколкото през 17. г.с., което улеснява нагледното и интуитивно представяне на резултатите. Този тип анализ е от особена важност за настоящото проучване, тъй като показва не само времева динамика в количеството на изследваните маркери, но ги сравнява между два периода със значителни разлики в активността на невrogenезата.

6.1.4. Обосновка за избора на корелации

Получените до тук количествени данни за микроглия са интересни сами по себе си, тъй като изследват подробно (1) разпределението на микроглията, (2) разпределението на **субпопулация** микроглия, позитивна за маркера HAM56, който досега не е проучван по време на **развитието при човек**, и (3) разпределението на пролиферираща микроглия в палиума по време на развитието при човек в два ключови времеви периода.

Въпреки това, съществен интерес представлява търсенето на зависимости при корелирането на тези данни с данните за прогенитори. При човек можем да търсим корелации между количествата на маркерите за микроглия и прогенитори без експериментална интервенция, а при нативни физиологични условия. За целта е важно правилното интерпретиране на корелации и сравняването им с резултатите от опитите с животни. Важно е да отбележим, че липсата на корелация между количествените промени на микроглия и прогенитори не е задължително да означава липса на влияние на едните спрямо другите, тъй като взаимодействието между двата типа клетки не е задължително да има количествена страна.

Въпреки това, предвид натрупаните данни от животни за връзка между дейността на микроглията и развитието на популацията на прогениторите, можем да допуснем, че наличието на статистически значима корелация между двете подкрепя евентуална каузална връзка. Все пак, една отделна микроглиална клетка може да фагоцитира или стимулира чрез секреция ограничено количество съседни прогенитори. При значително взаимодействие между тези два вида клетки е логично да предположим, че ще е налице и значителна корелация между гъстотата на техните популации.

6.1.5. Обосновка на използвания статистически модел

При подбора на модела се избира такъв, който отговаря на определени критерии за съвпадение (fit), които се основават на разликите между предвижданията на модела и действителните измервания (residuals).

В данните, които ще анализираме, измерените променливи са базирани на брой клетки (цели положителни числа), отнесени или към площта, в която са измерени (брой клетки на единица площ), или към общия брой преброени клетки, т.е. фракции/честоти от даден брой клетки. За анализа на този тип данни най-подходящи са модели, които са ориентирани към такъв тип бройни данни.

Бройните данни (дори и да са нормализирани с площта или по друг начин) обикновено нямат нормално разпределение и имат дисперсия, която зависи от стойността им. Също така нямат стойности под нула, а изискването за нормално разпределение на остатъците е в противоречие с тези свойства. За да можем да ги моделираме с линеен модел, моделираме като зависима променлива не самата бройка клетки, а нейния логаритъм. Затова за този вид данни използваме така наречения *negative binomial* модел, който позволява да моделираме този процес. С този тип модели даваме отговор на въпроса „Има ли и каква зависимост между броя на единица площ клетки с определен фенотип и изследваните фактори?“

Тук характерен проблем представляват фракциите клетки: фракцията/пропорцията има възможни стойности между 0 и 1 и не може да има отрицателна стойност. За моделиране на такива променливи – пропорции, вероятности, може и често се използва т.нар. *logit* трансформация: при нея взимаме логаритъма на отношението между положителната и отрицателната пропорция или $\log(\text{Cell_fraction}/(1-\text{Cell_fraction}))$. Така

се получава показател, който има възможни стойности между $-$ и $+$ безкрайност и това нормализира остатъците в модела. Тази трансформация и този вид данни се моделират с помощта на т.нар. логистичен (binomial) модел (Fox and Weisberg 2019).

В нашия случай обаче по-подходящо е да моделираме данните си като бройни данни (каквито са с модел, подобен на този за клетки на единица площ). Тъй като тук моделираме фракции/отношения на вероятности, въпросът, който задаваме, е следният: има ли зависимост (и какъв е характерът ѝ) между факторите и броя клетки от определен фенотип, при положение, че принадлежат към определен фенотип.

Казано по друг начин, бройният модел моделира joint probability дадена клетка да е едновременно A&B от всички възможни клетки, а логистичните моделират условната вероятност дадена клетка да принадлежи към A при положение, че вече принадлежи към B.

При оценяване размера на ефектите използвахме post hoc тестване на интересоващите ни групи. Това не се прави на осреднените сурови данни, а става посредством т.нар. маргинални средни (marginal means). Това са средни стойности, изчислени въз основа на модела за различни нива на факторите, които ни интересуват, и осреднени по останалите. Изчислените маргинални средни представляват прогноза на модела за реалните стойности и техните интервали на доверителност. Макар и да се различават от наблюдаваните средни, последващите сравнения са достоверните и ни позволяват да съдим за различията и ефектите на различните фактори, защото те се съобразяват с параметрите на дистрибуцията, от която вероятно произхождат данните. По тази причина тези тестове имат по-голяма мощност (power) (Lenth 2023).

Поради характерните особености на материала за изследване и прилаганите имунохистохимични методи известен дял от наблюденията са непълни, тоест в тях са налице данни само за някои (но не и за всички) корелирани маркери. В такива случаи е възможно да се измери асоциацията само между пълните наблюдения, като непълните се изключват от анализа. Подобен подход обаче променя разпределението на оставащите наблюдения и изкривява резултатите от анализа. Затова съвременната статистическа наука препоръчва липсващите данни да бъдат импутирани (попълнени) с надеждни обосновани предположения, които не променят дисперсията на реалните наблюдения (Kuhn, Jackson, and Cimentada 2022). Описаният в глава „Материали и методи“

йерархичен подход при импутацията запази разпределението на данните, използвани за корелационния анализ, практически непроменено в сравнение с разпределението на „реалните“ наблюдения.

6.1.6. Ограничения и недостатъци на настоящото проучване

Основен проблем при работа с човешки ембрионални тъкани е трудността на събиране на материал поради етични съображения. Това значително ограничава броя случаи, които може да се включат в изследването. Голям процент от събраните материали отпадат и поради лошо качество, открита патология и прекалено голям послесмъртен интервал.

Липсата на контрол над послесмъртния интервал е друго важно ограничение. Не винаги е ясно точно кога е настъпила смъртта.

Тъй като се събират случаи от спонтанни аборти, е напълно възможно наличието на скрита патология, която не може да се диагностицира морфологично. Микроглиалната активация е възможно да е вследствие на смъртта, а не нормален физиологичен процес по време на развитието.

Друг проблем е ниската гъстота или фракция на някои от изследваните маркери дори при околичествяването им на много голяма площ. Дори при умелото използване на импутация, това ограничава значително броя наблюдения, което затруднява статистическия анализ или го прави невъзможен.

Най-ключово предизвикателство е, че при търсене на асоциации между микроглия и прогенитори работим с корелации, при което не можем да правим дефинитивни заключения по отношение на вероятни каузални връзки. Решението тук е правилен подбор на видовете корелации и интерпретацията им в светлината на откритото дотук при изследвания с животни.

6.2. Анализ на микроглия в палиума

6.2.1. Специфично разпределение на IBA1⁺ в герминативните зони и динамика във времето

При пръв преглед на средните стойности на IBA1⁺ клетки на mm² се вижда ясна закономерност – и при двата времеви периода гъстотата е най-голяма във VZ и iSVZ, а след това рязко спада.

През 17. г.с. VZ и iSVZ имат сходна гъстота на IBA1⁺ клетки, но значително повече, около 4-6 пъти, от oSVZ. Интересно е, че въпреки голямата разлика между iSVZ и oSVZ, няма разлика при сравнение на oSVZ с другата ѝ съседна зона – IZ. Последващите в дорзална посока зони също нямат разлика помежду си. Единствено VZ и iSVZ имат значителна разлика спрямо CP, около 8–9 пъти, останалите зони, включително oSVZ, не.

Тези сравнения отдиференцират два отчетливи региона със значително различна гъстота на IBA1⁺ клетки през 17. г.с.: вентрален регион, отговарящ на VZ/iSVZ с висока гъстота, и дорзален регион, отговарящ на oSVZ–CP с по-ниска гъстота.

Интересното е, че границата между двата региона е през средата на основните пролиферативни зони, между iSVZ и oSVZ. Към 17. г.с. oSVZ е основната неврогенна зона (Lui, Hansen, and Kriegstein 2011), докато VZ и iSVZ са с намаляващ принос към неврогенезата. По-високата гъстота на IBA1⁺ клетки при тях може да се дължи на усилена фагоцитоза, регулираща неврогенезата в тези зони. Активният принос на oSVZ към все още активната неврогенеза през 17. г.с. предполага по-ниски нужди от микроглиална фагоцитоза на прогенитори, което може да обясни значително по-ниските стойности на IBA1⁺ клетки там.

През 20. г.с. картината е с някои прилики, но и с драстични разлики. Двата различни региона на гъстота на IBA1⁺ клетки остават непроменени. Отново най-много от тях се откриват във VZ и iSVZ, които отново не показват статистически значима разлика помежду си. Отново гъстотата рязко спада в oSVZ спрямо iSVZ, около 7 пъти. Разликата между тези две зони през 20. г.с. е още по-голяма спрямо 17. г.с., при която е около 4 пъти.

Но оттук нататък всички зони, с изключение на dSP, показват статистически значима разлика спрямо CP. През 17. г.с. VZ/iSVZ притежават 8–9 пъти повече от изследваните клетки спрямо CP, но през 20. г.с. разликата нараства до 15–17 пъти. Ако през 17. г.с. не се откри значима разлика между oSVZ и CP, то през 20. г.с. такава има – около 2 и половина пъти. От това ясно личи, че през 20. г.с. зоната с най-малко от изследваните клетки е CP, като разликата в отношението спрямо VZ/iSVZ е нараснала почти два пъти.

При сравнение на аналогичните зони между 17. и 20. г.с. не откриваме значима разлика в стойностите на IBA1⁺ клетки в CP между двата

периода, но откриваме голяма такава при основните пролиферативни зони: гъстотата във VZ, iSVZ и oSVZ нараства приблизително два пъти, но остава непроменена в CP, т.е. повишената разлика между най-вентралните и най-дорзалната изследвана зона се дължи изключително на разрастване на IBA1⁺ клетки вентрално.

Макар че най-скорошни данни показват как невrogenеза при човек съществува и през трети триместър, то основната ѝ вълна затихва около 20. г.с. (Penna et al. 2021). Като вземем предвид ролята на микроглията да регулира невrogenезата чрез фагоцитоза на прогенитори, то нашите резултати отговарят на тази времева динамика: през 17. г.с., периода на активна невrogenеза, имаме най-високи нива на IBA1⁺ клетки единствено във VZ и iSVZ, които през този период са пролиферативните зони с вече намаляваща невrogenна роля, но през 20. г.с. с общото затихване на невrogenезата виждаме двойно повишение на гъстотата на IBA1⁺ клетки не само във VZ/iSVZ, но вече и в oSVZ.

Почти два пъти е повишението и в IZ. Тази зона е ключова миграторна зона, а микроглията може да влияе на невроналната миграция (Aarum et al. 2003). Повечето неврони мигрират между 12. и 20. г.с. (Leibovitz, Lerman-Sagie, and Haddad 2022), но след това следват други миграционни вълни, които продължават и през трети триместър (Keeney, Dumas, and Sikela 2014).

Микроглията може да повлиява растящите аксони по пътя им към крайната им цел чрез взаимодействие с екстрацелуларния матрикс и насочващи молекули (Judaš et al. 2005). В допълнение, проучвания при котки показват, че микроглията може да регулира транзитни аксони в корона радиата по време на развитието (Rocheffort et al. 2002; Innocenti, Clarke, and Koppel 1983).

От това можем да заключим, че значителното нарастване на IBA1⁺ клетки тук през 20. г.с. може да има отношение както към късните етапи на основната вълна миграция, така и да отразява акумулация на микроглия като подготовка за роля при по-късните миграционни процеси в IZ.

Може би най-голям интерес тук представлява фактът, че именно IZ е характерен таргет за увреда (перивентрикулна левкомалация) при недоносени, родени между 22. и 30. г.с. Има голямо количество данни от проучвания при животни и хора за роля на микроглията при тези лезии на бялото вещество, които водят до моторни, сетивни и поведенчески дефицити (Monier et al. 2007).

За разлика от 17. г.с., през 20. г.с. имаме значителна разлика в гъстотата на IBA1⁺ клетки между dSP и sSP, като първата е с около 2 пъти по-голямата гъстота от втората. Мотивацията ни да разделим и сравним двете части на SP, вместо да я изследваме като цяло, беше продиктувана от очевидната разлика в гъстотата на IBA1 при общ преглед на сканираните хистологични препарати преди извършване на каквото и да е околичествяване (фиг. 5.3.). Количествените данни и последващите сравнения потвърждават нашата хипотеза, че микроглията не е разпределена хомогенно в SP и е значително повече във вентралните ѝ части, отколкото в дорзалните. Това важи единствено за 20., но не и за 17. г.с.

Важно е, че не откриваме значима разлика в гъстотата на микроглията в SP между двата времеви периода, но откриваме разлика между двете ѝ части през 20. г.с. Това е в противоречие с данните от други автори, които съобщават, че микроглията се разпределя хомогенно из SP към 20. г.с. (Menassa et al. 2022).

През 17. г.с. разликата между dSP и sSP е сходна с тази през 20. г.с. – приблизително 2 пъти, но за разлика от 20. г.с. не е статистически значима. Интервалът на доверителност в отношението dSP/sSP и при двата времеви периода е сравнително тесен и много сходен. Освен това, оглед на малко увеличение на цялата зона показва хомогенно разпределение на микроглията през 17. г.с., без очевидни видими разлики между dSP и sSP, но голямата гъста лента IBA1⁺ клетки в dSP личи прекалено ясно през 20. г.с. при всички изследвани случаи. От това можем да заключим, че повишената гъстота на IBA1 в dSP спрямо sSP през 20. г.с. е реална и отразява физиологична роля на микроглията.

Нашите количествени резултати потвърждават по-ранни наблюдения на други автори, че от 19. г.с. нататък се наблюдава по-голяма плътност на микроглиални клетки в dSP спрямо sSP (Monier et al. 2007).

Счита се, че основен период на аксонален растеж, преразпределение, намиране на цел и синаптогенеза са 22–40. г.с., като болшинството синапси се модулират или формират постнатално (Kostović et al. 2021; Budday, Steinmann, and Kuhl 2015). Следователно липсата на статистически значими разлики в гъстотата на IBA1⁺ клетки между 17. и 20. г.с. при SP и CP е очаквана: в тези зони не се извършва активна невrogenеза и изследваният времеви период е прекалено ранен, за да очакваме значими разлики по отношение на формирането на синапси, при което би-

хме могли да видим и евентуални разлики в гъстотата на IBA1⁺ клетки при евентуална тяхна ангажираност в тези процеси. Интересно е дали привличането на микроглия в dSP през 20. г.с. не е подготовка за ролята ѝ при последващите процеси на намиране на цел и преразпределение на изчакващите аксони в нея.

Известно е, че SP на развиващия се мозък през втори триместър е източник на хемокини, които селективно привличат моноцити и макрофаги и промотират тяхната диференциация (Rezaie et al. 2005), следователно можем да допуснем подобни ефекти и при микроглията. Освен това, IZ и SP са главните места за диференциация на астроцитите през втори триместър (Rezaie et al. 2005), следователно привличането на микроглия в SP я прави suspectен играч. Но тези процеси са по-изразени към края на втори триместър, следователно липсата на значими разлики между 17. и 20. г.с. на този етап са очаквани.

6.2.2. Субпопулации IBA1⁺HAM56⁺ показват различно разпределение и динамика от IBA1⁺

През 17. г.с. процентът IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ е малък (едноцифрен), освен във iSVZ, където достига до около 20%. Макар iSVZ да съдържа над 6 пъти повече от изследваните клетки спрямо VZ, тази разлика не е статистически значима ($p = 0,0595$). Въпреки това, стойността на p е гранична и предвид голямата разлика между двете зони и малкия получен брой наблюдения при VZ, можем да допуснем възможността, че при увеличение на броя наблюдения при последващи проучвания, тази разлика ще излезе значителна.

Не се установи значима разлика между останалите съседни зони и между всяка спрямо CP, с изключение при iSVZ, която съдържа почти 8 пъти повече от изследваните клетки спрямо CP. Тук липсата на статистически значими разлики отново може да се дължи на недостатъчен брой наблюдения поради рядкостта на проучвания маркер. Въпреки това, значимостта на iSVZ като зона с най-голяма концентрация на IBA1⁺HAM56⁺ клетки през 17. г.с. личи ясно.

През 20. г.с. картината е сходна, като отново единствена значима разлика се откри между iSVZ и CP, като iSVZ съдържа около 5 пъти повече клетки. Отново имаме една гранична стойност – oSVZ има малко над 3,5 пъти повече от изследваните клетки спрямо CP при $p = 0,0848$.

Въпреки това, липсата на значими разлики между зоните през 20. г.с. може да се вземе насериозно, тъй като през 20. г.с. личи нарастване на фракцията IBA1⁺НАМ56⁺ клетки спрямо 17. г.с. и това е статистически значимо.

Фракцията IBA1⁺НАМ56⁺ от IBA1⁺ нараства над 6,5 пъти във VZ, над 4 пъти във oSVZ и IZ и почти 3,5 пъти в SP. Интересно е, че няма статистически значима разлика между двата периода при iSVZ, която е най-богата на въпросния маркер, както и при никоя от подразделенията на SP.

Сравнено с описаната динамика и разпределение на IBA1⁺ клетки, IBA1⁺НАМ56⁺ клетките показват сходна картина, но и с някои различия. Общото е, че и тук наблюдаваме забележително нарастване на броя им през 20. спрямо 17. г.с. във VZ, oSVZ и IZ. Ако гъстотата в тези зони на IBA1⁺ нараства между 1,5. и 2 пъти от 17 към 20. г.с., то фракцията на IBA1⁺НАМ56⁺ от всички IBA1⁺ в тези зони нараства забележимо повече: между 4 и 7 пъти. Интересно е, че нарастването в iSVZ и при двата маркера е еднакво по стойност между 2-та времеви периода, макар че при IBA1⁺НАМ56⁺ разликата да не е статистически значима.

От това можем да допуснем, че IBA1⁺НАМ56⁺ клетки играят важна роля по време на процесите и през двата времеви периода. Значителното увеличение на фракцията им във VZ през 20. г.с. ги прави суспектни играчи при потискане на невrogenезата в тази зона, но не и в iSVZ. Голямото увеличение в oSVZ през 20. г.с., значително по-голямо спрямо 17. г.с., е интересно предвид колко гранична е 20. г.с. като период за невrogenезата. Можем да допуснем роля на IBA1⁺НАМ56⁺ клетки в късната невrogenеза в oSVZ, но дали те стимулират прогениторите в тази зона, или се разрастват, подготвяйки постепенна инхибиция на невrogenезата след 20. г.с., е трудно да се отговори. Ако последващи проучвания покажат, че първата хипотеза е вярна, то IBA1⁺НАМ56⁺ клетките биха притежавали особено интересна двойна функция: инхибиция на невrogenезата във VZ, но стимулиране в oSVZ. Все пак, това значително нарастване на процента IBA1⁺НАМ56⁺ от всички IBA1⁺ клетки от 17. към 20. г.с. отразява активирани фагоцитарен фенотип на микроглията (Tonchev et al. 2003), следователно най-вероятното обяснение за разрастването им в тези зони е участие при инхибиране на невrogenезата чрез фагоцитоза на прогениторите.

Виждаме и над 4 пъти нарастване в IZ. Тук интерпретацията е сходна с описаната относно двойното нарастване на гъстотата на IBA1⁺ през 20. спрямо 17. г.с. в тази зона: възможна роля както при късните етапи на основната вълна миграция, така и като подготовка за регулация на последващите миграторни процеси. Фракцията на IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ в тази зона нараства значително повече от тоталния брой IBA1⁺, което предлага интересна хипотеза за активно влияние на тази микроглиална субпопулация тук. Редица проучвания показват разнообразни роли на микроглията при развитието на бялото вещество, включително използване на фагоцитиращата си функция за проправяне на път за растящи аксони (Pont-Lezica et al. 2014) и елиминация на транзитни такива (Innocenti, Clarke, and Koppel 1983). Тези наблюдения могат да обяснят разрастването на активирания фагоцитарен IBA1⁺HAM56⁺ фенотип тук. От друга страна, има и данни, че микроглията може да се асоциира с развиващите се пътища без наличието на патология, стимулирайки аксоналния растеж чрез освобождаване на трофични фактори (Pont-Lezica et al. 2014).

Другата важна разлика с динамиката на IBA1⁺ е значимото близо 3,5 пъти нарастване на фракцията IBA1⁺HAM56⁺ в SP през 20. г.с. Болшинството неврони, които формират SP, са мигрирали там до към 20–21. г.с. (Xu et al. 2021), следователно по-голямата фракция на IBA1⁺HAM56⁺ там през 20. г.с. може да отразява ангажиране в процесите на диференциация и матурация на клетките на бъдещия кортекс.

Интересно е, че в SP не наблюдаваме разлики нито между отделните части, нито между двата времеви периода. Като цяло процентът на IBA1⁺HAM56⁺ клетки там е изключително малък. От това можем да заключим, че тези клетки не участват активно в процесите в SP през изследваните времеви периоди.

В резюме, от получените данни виждаме масивно значително повишение на фракцията на IBA1⁺HAM56⁺ клетки през 20. г.с. във всички зони освен iSVZ и двете SP. Можем да заключим, че тази субпопулация микроглия вероятно има отношение към късните етапи на неврогенезата, включително регулирането ѝ във VZ и oSVZ, но не и в iSVZ, в процесите на миграция и регулация на аксоналния растеж в IZ и диференциация в SP, но не и при свързочните процеси в SP.

6.2.3. Пролиферацията на микроглия е малка и хомогенна по отношение на зоните и времевите периоди

От средните стойности виждаме, че във всички зони и при двете седмици сравнително малък (едноцифрен) процент от микроглията пролиферира. Интересно е, че най-високи стойности пролиферираща микроглия и при двете седмици получаваме за IZ, а най-малки в SP. Във VZ и CP се наблюдава увеличение през 20. спрямо 17. г.с. Въпреки това, никоя от тези разлики не показва статистическа значимост нито при сравнение между отделните зони, нито при сравнение между седмиците, затова тези резултати трябва да се интерпретират внимателно. Налице са доста широки интервали на доверителност и големи стойности на p. Малкият процент на пролиферация, съчетан с намаляващата гъстота на микроглията дорзално, може да обясни липсата на статистическа значимост поради намаляващия брой подходящи наблюдения, които се сравняват.

Това е важно предвид сравнението на тези резултати с досега публикуваните данни за пролиферацията на микроглия по време на развитието при човек.

Menassa et al. 2022 показват два основни прозореца на микроглиална пролиферация: първият, по-значим, между 5. и 8.. г.с., а вторият, по-малък, между 13. и 16. г.с. Извън тези два прозореца, процентът на микроглиална пролиферация е стабилен без значими разлики между гестационните седмици. Нашите резултати от времеви период след двата описани пролиферативни пика на микроглия подкрепят тези данни.

По отношение на разликата между зоните авторите на проучването съобщават за най-висока степен на микроглиална пролиферация в IZ и SP. Нашите резултати също показват най-висок процент IBA1⁺KI67⁺ клетки в IZ, но, за разлика от горното проучване, получихме най-ниски средни стойности в SP. Липсата на статистическа значимост между отделните зони, която получихме, може да се дължи на малкия брой наблюдения предвид малкия процент пролиферация или на уеднаквяване на пролиферацията на микроглия извън двата прозореца.

6.3. Анализ на прогенитори

Тъй като целта ни е да търсим корелации между микроглия към прогенитори в развиващия се палиум, след като подробно проучихме количественото разпределение на микроглия, нейните NAM56⁺ субпопулации и нейната пролиферация в герминативните зони на палиума през двата времеви периода, пристъпихме към околичествяване на прогениторите и тяхната пролиферативна активност.

Тъй като още от оцветяването с DAPI ясно личи как различните герминативни зони са с очевидна разлика в гъстотата на клетките в тях, преценихме като по-подходящо да представим гъстотата на прогениторите не като клетки на площ, а като процент на SOX2 от всички DAPI⁺ клетки.

SOX2 е много подходящ маркер за нашите нужди, тъй като се експресира от всички прогенитори по време на ембрионалната неврогенеза (Graham et al. 2003) и помага за отдиференцирането им от тангенциално мигриращи неврони от ганглионните еминенции (Ortega et al. 2018).

За изследване митотичната активност на прогениторите, използвахме класическия маркер за пролифериращи клетки KI67 (Sun and Kaufman 2018) и изчислихме процента SOX2⁺KI67⁺ клетки от всички SOX2⁺ клетки.

Тези два маркера са подробно изучени в литературата и тук няма да ги дискутираме подробно. За нашите цели имахме нужда от количествени данни от тези маркери от същите тъкани, в които измерихме маркерите за микроглия, за да можем да търсим смислени отношения.

Накратко, разпределението на SOX2⁺ от нашите резултати следва очакванията: най-високо е количеството му в основните пролиферативни зони, особено VZ/ISVZ и намалява в дорзална посока.

Както се очаква, през 20. г.с. фракцията на SOX2⁺ намалява в основните пролиферативни зони, но тук интересното е, че наблюдаваме увеличение в IZ, dSP и sSP спрямо 17. г.с. Това можем да обясним с факта, че SOX2⁺ продължава да се експресира от някои прогенитори, дори след като се комитират към диференциране, както и от някои диференцирани неврони и глия (Mercurio, Serra, and Nicolis 2019; Bertolini et al. 2016).

Като цяло, количествените ни данни за SOX2 са почти идентични с резултати на наши колеги, изследвали този маркер в сходни тъкани при същите времеви периоди (Ангелова 2015).

Относно процента делеящи се прогенитори също виждаме очаквана картина: и при двата времеви периода, от 3-те основни пролиферативни зони, oSVZ е с най-висока пролиферация. Пролиферацията е сравнително висока и в IZ, но рязко спада към dSP. През 20. г.с. наблюдаваме драматичен спад на пролиферацията във всички зони, освен IZ.

6.4. Корелации между микроглия и прогенитори

Корелирахме количествените данни от всеки микроглиален маркер с всеки маркер за прогенитори. По този начин получаваме шест възможни двойки корелирани променливи. За допълнителна информативност, която може да ни помогне за интерпретацията на резултатите, избрахме различни нива на стратификация на анализа.

На първо ниво сумираме данните от всички герминативни зони за даден времеви период, чрез което разглеждаме палиума като цяло за този период. Предимствата тук са, че значително увеличаваме броя наблюдения, което е важно предвид рядкостта на някои от изследваните маркери като например IBA1⁺KI67⁺.

При второто ниво на стратификация сумираме данните от двата времеви периода за всяка гестационна седмица поотделно и търсим корелации в нея. По този начин разширяваме анализирания времеви период.

При третото, най-фино ниво на стратификация правим пълна разбивка, при която анализираме отношенията между променливите в конкретна герминативна зона при конкретен времеви период. Тук предимството е, че получаваме най-подробна информация, но значителен недостатък са малкият брой получени наблюдения за някои от маркерите, което затруднява анализа или го прави невъзможен.

6.4.1. Корелации в палиума като цяло

Гъстотата на IBA1⁺ корелира силно позитивно с обема и пролиферацията на прогениторите съобразно времевия период.

Анализът върху целия палиум като цяло показва много силна положителна корелация между гъстотата на IBA1⁺ клетки и процента SOX2⁺ от DAPI и за двата времеви периода. Но силна положителна корелация между IBA1⁺ и делеящи се SOX2⁺KI67⁺ прогенитори виждаме единствено през 17., но не и 20. г.с.

Резултатът, че повече микроглия корелира с повече прогенитори и при двата времеви периода, е интересен, предвид, че гъстотата на микроглията нараства, а тази на прогениторите намалява от 17. към 20. г.с. От това, както предположихме по-горе при обсъждането на разпределението на IBA1⁺, първо бихме очаквали, че микроглията би имала инхибиторна роля по отношение на неврогенезата през 20. г.с. Възможно е и нейното нарастване тогава да се дължи на усилена пролиферация, но не открихме статистически значима разлика между двата периода.

Каквото съвпада с очакваната интерпретация е, че повече микроглия се асоциира с повече делящи се прогенитори единствено през периода на по-активна неврогенеза, но не и след това.

Обобщено, тези данни показват възможно стимулиране на неврогенезата от микроглия, което изобщо не е изненадващо. Макар че повечето проучвания се фокусират върху негативната регулация на неврогенезата от микроглията чрез фагоцитиране на прогенитори или индуциране на апоптоза, има достатъчно данни, че микроглиалните клетки са способни и да промотират неврогенезата чрез отделяне на невротрофни фактори и цитокини, включително BDNF, IGF-1, TNF- α и др (Araki, Ikegaya, and Koyama 2021).

Интересно е, че експресията на тези фактори е с най-висока степен по време на развитието и рязко спада непосредствено след раждането, но тяхната експресия при възрастни се запазва именно в неврогенните зони на постнаталния мозък като SVZ на хипокампа (Dyer et al. 2016; García-Segura et al. 1991).

Инжектирането на brain-derived neurotrophic factor (BDNF) в хипокампа на плъхове увеличава количеството пролифериращи зърнести клетки (Scharfman et al. 2005). Knockout на TrkB рецептора за BDNF от невроналните прогенитори води до инхибиция на тяхната пролиферация и спад в обема на зърнения слой на хипокампа (Yun Li et al. 2008).

BDNF, отделян от микроглия, е необходим за формирането на дендритни шипчета след заучаване в моторния кортекс (Parkhurst et al. 2013). Макар че knockout на микроглиалния BDNF не води до спад на тоталната експресия на BDNF в кортекса и хипокампа, микроглията вероятно регулира формирането на дендритни шипчета чрез локално отделяне на BDNF от своите израстъци (Araki, Ikegaya, and Koyama 2021).

Друг важен разтворим фактор е insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Микроглията може да експресира IGF-1 при физиологични условия без наличието на възпаление (Suh et al. 2013). Проучванията показват как IGF-1 може да стимулира неврогенезата чрез увеличение на пролиферацията на невроналните прогенитори *in vivo* и *in vitro* (Åberg et al. 2003; 2000), промотиране на тяхната диференциация (Yuan et al. 2015) и оцеляване, най-вероятно чрез ефекти, инхибиращи апоптозата (W. Liu et al. 2009).

Интересна е двойната роля на tumor necrosis factor- α (TNF- α) върху неврогенезата. TNF- α е добре-проучен възпалителен медиатор, отделян от активирана микроглия при патологични условия (Welsch-Alves and Milner 2013). Макар че високи дози TNF- α водят до апоптоза на невронални прогенитори, ниски дози могат да стимулират тяхната пролиферация и диференциация (Bernardino et al. 2008). Тези разнородни ефекти могат да се обяснят с различните функции на отделните подтипове рецептори за TNF- α (Chen and Palmer 2013). В допълнение, TNF- α , отделян от микроглия, регулира формирането на възбудни синапси в хипокампа (Y. Liu et al. 2017).

Описаните данни ясно показват, че микроглията отделя молекули, които могат да стимулират неврогенезата при физиологични условия.

Субпопулацията IBA1⁺HAM56⁺ корелира силно позитивно със SOX2 през 20. г.с.

През 20. г.с. се появява нова силна положителна корелация между фракцията IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ с фракцията SOX2⁺ от DAPI. Ако по-голямата гъстота на IBA1⁺ се асоциира с повече SOX2⁺ прогенитори и през двата времеви периода, то такава асоция между субпопулацията IBA1⁺HAM56⁺ и SOX2 откриваме единствено през 20. г.с. но не и през 17. г.с. Както видяхме, IBA1⁺HAM56⁺ субпопулацията микроглия нараства драстично през 20. г.с., когато очакваме затихване на основната вълна неврогенеза. Тази активация на микроглията предполага роля на IBA1⁺HAM56⁺ клетките в най-късните етапи на неврогенезата и/или след това. Както предположихме по-горе при разглеждане на динамиката на разпределението на фракциите IBA1⁺HAM56⁺, тяхното увеличение през 20. г.с. и положителната корелация със SOX2 може да се интерпретира или като стимулиране на най-късните етапи на неврогенезата, или подготовка за нейното инхибиране на непосредствен по-късен етап. За

отговор на този въпрос бъдещи проучвания трябва да измерят корелацията между двете променливи през следващите г.с.

Евентуално наблюдаване на обръщане на посоката на корелацията от позитивна към негативна би подкрепило тезата за възможна роля на IBA1⁺HAM56⁺ при инхибиране на неврогенезата след основния ѝ период. Разбира се, възможно е и да няма каузална връзка между двете променливи. Със затихване на неврогенезата е възможно тази фракция клетки да взема участие и при постепенното увеличение на процесите на глиогенеза и диференциация.

6.4.2. Корелации при сумирани времеви периоди

Субпопулацията IBA1⁺HAM56⁺ корелира силно негативно с пролиферацията на прогениторите в някои зони на палиума.

При сумиране на двата времеви периода и разбивка по зони откриваме силна негативна корелация между процента IBA1⁺HAM56⁺ от всички IBA1⁺ с процента SOX2⁺KI67⁺ от всички SOX2⁺ за VZ, IZ и dSP. Това е донякъде очаквано предвид динамиката на двете променливи във времето: през 17. г.с. има повече пролифериращи прогенитори спрямо 20. г.с., но през последната има много по-голяма фракция IBA1⁺HAM56⁺ клетки, т.е. с нарастване на едната променлива другата намалява. Наблюдението се потвърждава от тази статистически значима корелация.

Тези резултати са в синхрон с наблюдаваната времева динамика на IBA1⁺HAM56⁺ клетките и подкрепят нашите предположения от по-горе за евентуална тяхна инхибиторна роля на пролиферацията във VZ през 20. г.с. Изненаната тук е наличието на корелация в двете съседни IZ и dSP, особено в последната, предвид колко рядка е тази субпопулация микроглия там. Т.е. тези резултати показват, че повече IBA1⁺HAM56⁺ клетки се асоциират с по-малко пролифериращи прогенитори в най-вентралната и най-дорзалните измерени зони. При наличие на каузална връзка е напълно възможна инхибиторна роля на тази субпопулация микроглия във VZ, която на този етап би трябвало да е с най-малък принос към неврогенезата, съответно, очакваме да бъде най-потисната. Липсата на корелации в двете SVZ може да отразява тяхната по-голяма роля в неврогенезата по време на изследваните времеви периоди. Потискането на пролиферацията в дорзалните зони също е логично, предвид тяхната ангажираност в процесите на миграция и диференциация.

6.4.3. Корелации при пълни разбивки по период и зона

При най-ниското ниво на стратификация, при което правим пълна разбивка по седмици и зони, не откриваме нито една статистически значима корелация през 17. г.с. През 20. г.с. откриваме две силни негативни корелации: в dSP между IBA1⁺HAM56⁺ и SOX2⁺ и в oSVZ между IBA1⁺KI67⁺ и SOX2⁺.

Субпопулацията IBA1⁺HAM56⁺ корелира силно негативно със SOX2 в dSP на 20. г.с.

Тази корелация в dSP е крайно интересна на фона на предвид разочароващите резултати. По-горе разгледахме негативна корелация между HAM56 и пролифериращите прогенитори в тази зона при сумиране на двата времеви периода, а при по-фината разбивка получаваме и негативна корелация между HAM56 и SOX2. Резултатите показват и една негативна корелация с много гранична статистическа значимост ($p = 0,0539$) между процента IBA1⁺HAM56⁺ от IBA1⁺ с процента SOX2⁺KI67⁺ от SOX2⁺ в IZ. Макар и гранична, тази корелация съвпада по посока и размер с резултатите за същата зона при сумиране на двата времеви периода.

По този начин от няколко разгледани нива на стратификация получаваме ясна негативна асоциация между IBA1⁺HAM56⁺ и SOX2⁺KI67⁺ в двете съседни IZ и dSP за 20. г.с., като в dSP такава корелация е налице и между IBA1⁺HAM56⁺ и SOX2. Наличието на SOX2⁺ клетки в двете зони означава или мигриращи прогенитори или диференциращи се неврони/глия. И в двата случая инхибиране на тяхната пролиферация в тези зони е очакван процес от развитието. Тази корелация между активирана IBA1⁺HAM56⁺ микроглия в dSP е с важно практическо значение, предвид специфичната чувствителност на невроните в SP към патологични стимули, което е свързано с шизофрения, аутизъм, епилепсия и морфологични аномалии на мозъка (Pogledic et al. 2020).

Пролифериращата микроглия корелира силно негативно със SOX2 в oSVZ на 20. г.с.

Силната негативна корелация между пролиферацията на микроглията и фракцията прогенитори в oSVZ през 20. г.с. може да се интерпретира по няколко начина. Първо, с постепенния спад на неврогенезата

в тази главна пролиферативна зона и намаляващите нужди от контрол над прогениторите микроглиалните клетки минават в процес на делене за регулация на собствената си популация. От друга страна, можем да предположим и че през този период в тази зона необходимостта от контрол над прогениторите е завишена и/или микроглията се подготвя за тяхното фагоцитиране на последващ етап, съответно пролиферацията на микроглията отразява повишените нужди от нея. Разбира се, винаги остава и третата възможност, при която корелацията е случайна. Предвид работата единствено с корелации и липсата на статистически значими разлики между седмиците и при двете обсъждани променливи, не можем да кажем със сигурност коя интерпретация е по-вероятна.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепциите ни за микроглия са извървели дълъг път от откриването ѝ досега: от обикновен предимно неактивен макрофаг до клетка с уникален произход и ключова активна роля по време на развитието.

Настоящото проучване подробно околичества разпределението и пролиферацията на микроглия и нейни субпопулации в герминативните зони на палиума през два ключови периода от развитието. Доколкото можем да съдим от получените резултати, настоящото проучване изпълни поставената цел и задачи.

Нашите резултати потвърдиха наблюденията в човешки фетален теленцафалон на други автори и ги обогатиха с конкретни количествени данни и сравнения.

За пръв път показваме IBA1⁺HAM56⁺ субпопулации микроглия по време на развитието при човек.

При корелирането на получените от нас данни за микроглия с тези за прогениторите и тяхната пролиферативна активност показахме вероятна стимулация на неврогенезата от микроглията като цяло и интересна, възможно хетерогенна, роля на IBA1⁺HAM56⁺ клетките в зависимост от герминативната зона.

Като имунна клеткаq микроглията е крайно чувствителна на промени в средата и може да реагира чрез силен провъзпалителен отговор. От това следва, че ключовите ѝ роли при регулацията на неврогенезата и синаптогенезата са неизменно свързани и с големи рискове в случай на пре- и перинатална увреда.

Поради специфичността на човешката психо- и невропатология, разбирането на тези процеси при човек е от ключово значение.

Надяваме се, че настоящият труд ще вдъхнови бъдещи изследователи за по-подробни проучвания на ролята на микроглията по време на развитието при човек.

8. ИЗВОДИ

1. И през двата времеви периода (17. и 20. г.с.) най-голяма гъстота на IBA1⁺ клетки се наблюдава във VZ/iSVZ, докато в останалите зони гъстотата рязко спада.
2. Гъстотата на IBA1⁺ клетки значимо нараства след 17.г.с. в зоните VZ, SVZ, IZ.
3. dSP притежава по-голяма гъстота на IBA1⁺ клетки спрямо sSP през 20. г.с.
4. Гъстотата на IBA1⁺ клетки корелира с количеството на SOX2⁺ клетки.
5. Гъстотата на IBA1⁺ клетки корелира с пролиферацията на SOX2⁺ клетки през 17. г.с.
6. По-малко от 10% от всички микроглиални клетки показват пролиферативна активност през изследваните периоди и в изследваните зони.
7. Фракцията пролиферираща микроглия корелира негативно с фракцията прогенитори в oSVZ през 20. г.с.
8. NAM56 се експресираща в дорзалния палиум на човешки фетален теленцефалон и маркира специфични субпопулации микроглия.
9. IBA1⁺NAM56⁺ микроглиални клетки значимо се увеличават през 20. г.с. в зоните VZ, oSVZ, IZ и CP.
10. Количеството на IBA1⁺NAM56⁺ клетки корелира с фракцията количество на SOX2⁺ от DAPI единствено прогенитори, през 20. г.с.
11. Количеството на IBA1⁺NAM56⁺ клетки корелира негативно с количеството на пролиферарищи SOX2⁺ прогенитори в зоната dSP на 20. г.с.

9. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път се околичествява и сравнява гъстотата на IBA1 през 17. и 20. г.с. в герминативните зони на дорзалния палиум на човешки фетален теленцефалон
2. За първи път се демонстрира наличие на IBA1⁺НАМ56⁺ субпопулации микроглия по време на развитието на мозъка при човек
3. За първи път се околичествяват и сравняват субпопулациите IBA1⁺НАМ56⁺ в различни герминативни зони на дорзалния палиум на човешки фетален теленцефалон
4. За първи път се търсят корелации между пролиферираща микроглия и пролиферация на прогенитори в герминативните зони на дорзалния палиум на човешки фетален теленцефалон
5. За първи път се търсят корелации между НАМ56-експресиращи субпопулации микроглия и пролиферация на прогенитори в герминативните зони на дорзалния палиум на човешки фетален теленцефалон

10. ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

10.1. Публикации

1. Zhelezov, M. (2019). Microglial Adipobiology: A New Concept for Understanding the Adipose Tissue-Brain Crosstalk in Health and Disease. *Adipobiology* 10 (0): 25. doi:<https://doi.org/10.14748/adipo.v10.6538>.
2. Zhelezov, M., & Tonchev, A. (2018). Microglia are not brain macrophages?. *Biomedical Reviews*, 29, 99-108. doi:<http://dx.doi.org/10.14748/bmr.v29.5855>
3. Zhelezov, M. (2017). Microglia as Potential Regulators of Empathy and Prosocial Behavior – A Hypothesis. *Biomedical Reviews*, 27, 69-74. doi:<http://dx.doi.org/10.14748/bmr.v27.2113>

10.2. Доклади

Национални:

1. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10, 2018, Sofia, Bulgaria
2. XXIII national Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation, October 5 – 7, 2017, Varna, Bulgaria

Международни:

3. Black Sea Neurogenesis, 26-28 may 2022, Albena, Bulgaria – постер
4. XI International Symposium on Clinical Anatomy October 2 – 4 2020
5. Humboldt Kolleg, Science without Borders: Alexander von Humboldt’s concept in today’s world, September 18-21, 2019, Varna, Bulgaria
6. X International symposium on clinical anatomy – Varna, Bulgaria, October 6-8, 2016, Varna, Bulgaria

11. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на моите родители, че подкрепиха интересите ми още от най-ранна възраст и ми взеха първия микроскоп, когато бях във втори клас.

Благодаря на доц. д-р Георги Ников Чалдъков, д.м., че ми показва пътя към науката.

Благодаря на проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н., за дългогодишното приятелство и сътрудничество.

Благодаря на доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м., че ме научи „как се прави наука“ и ми помогна с толкова много технически неща, че ако ги изброя всичките, ще трябва да добавя още една глава към дисертацията.

Благодаря на колегите от катедра „Анатомия и клетъчна биология“ към МУ – Варна за приятелството и подкрепата.

Благодаря на д-р Ирена Стефанова Стоянова за отдадеността и прецизността при съвместната ни работа.

Благодаря на д-р Властимил Воханка за... е, той си знае за какво.