

**Медицински университет „Професор д-р Параскев Стоянов”
Факултет по медицина
Катедра по анатомия и клетъчна биология**

Д-р Мартин Николаев Иванов

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

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за присъждане на научна и образователна степен „Доктор”**

**Професионално направление:
7.1. Медицина**

**Научна специалност:
03.01.02 – „Анатомия, хистология и цитология”**

**Научен ръководител
доц. Стоян Павлов, д.м.**

Варна
2023

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	6
2. УВОД	9
3. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	11
3.1. Невронални стволови клетки и концепция за неврогенеза	11
3.2. Анатомия на субвентрикуларната зона при гризачи	13
3.3. Особености на субвентрикуларната зона при примати	15
3.4. Активиране на неврогенеза в резултат на мозъчна исхемия	21
3.5. Промяна на транскриптома в SVZ след мозъчна исхемия	25
3.6. Начини за изследване на неврогенезата	26
4. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	29
4.1. Цел	29
4.2. Задачи	30
5. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	31
5.1. Селектиране на гени за фенотипен анализ	31
5.2. Експериментални животни и човешки тъкани	31
5.3. Хирургични процедури	32
5.4. Обработка на тъканите	34
5.5. In situ хибридизационни оцветявания (колориметрични и флуоресцентни)	34
5.5.1. Изолация на РНК	34
5.5.2. Синтез на cDNA	35
5.5.3. Синтез на темплейт	36
5.5.4. Синтез на рибопроби	37
5.5.5. Колориметрично in situ хибридизационно оцветяване	38
5.5.6. Ростро-каудална експресия на избраните гени в нормален маймунски мозък	40
5.5.7. Ростро-каудална пролиферация в нормален маймунски мозък	41
5.5.8. Ростро-каудален анализ на експресия на избраните гени при различни бозайници, използвайки отворени бази данни	42
5.5.9. Флуоресцентно in situ хибридизационно оцветяване	43
5.6. BrdU протокол	48

5.7.	Фенотипен анализ на APLNR в нормален човешки мозък	48
5.8.	Контролни оцветявания и изследвания	49
5.9.	Заснемане на препаратите	52
5.10.	Обработка на изображенията	53
5.11.	Анализ на изображенията	57
5.12.	Обработка на данните и статистика	57
6.	РЕЗУЛТАТИ	60
6.1.	Анализ на характеристиката на експресия на гените в публичната база данни monkey-niche.org	60
6.2.	Анализ на характеристиката на експресия на TNC (Tenascin-C)	61
6.3.	Анализ на характеристиката на експресия на APLNR (Apelin receptor)	63
6.4.	Анализ на характеристиката на експресия на GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein)	64
6.5.	Анализ на характеристиката на експресия на CD38 (Cluster of differentiation 38).	66
6.6.	Ростро-каудална експресия на TNC	67
6.7.	Ростро-каудална експресия на APLNR	69
6.8.	Ростро-каудална експресия на GJA1	70
6.9.	Ростро-каудална експресия на CD38	71
6.10.	Ростро-каудален градиент в пролиферативната активност в SVZ	72
6.11.	Сравнение на ростро-каудалната експресия на избраните гени при различни бозайници	73
6.12.	Сравнение на ростро-каудалната експресия на TNC при различни бозайници	74
6.13.	Сравнение на ростро-каудалната експресия на APLNR при различни бозайници	75
6.14.	Сравнение на ростро-каудалната експресия на GJA1 при различни бозайници	76
6.15.	Сравнение на ростро-каудалната експресия на CD38 при различни бозайници	77
6.16.	Фенотипен анализ на избраните гени	77
6.16.1.	Фенотипен анализ на TNC (Tenascin-C).	78
6.16.2.	Фенотипен анализ на APLNR	82
6.16.3.	Фенотипен анализ на GJA1(Gap Junction Alpha-1 protein)	87
6.16.4.	Фенотипен анализ на CD38	91

6.16.5. Коекспресия между някои от избраните гени	95
6.17. Изясняване на различията в експресията на GFAP и Vimentin	98
6.18. Фенотип на APLNR позитивни клетки в SVZ от нормален човешки мозък	101
7. ОБСЪЖДАНЕ	111
7.1. Индуциране на експресия на гени след глобална исхемия	111
7.2. Експресия на гените TNC, APLNR, GJA1, TNC при гризачи.	111
7.3. Диференциална експресия по ростро-каудалната ос на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 при макак	113
7.4. Сравнителен анализ на експресията на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 с други бозайници	114
7.5. Ростро-каудален градиент на експресията на Ki67 в SVZ при различни видове	115
7.6. Фенотипна характеристика на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 в нормален маймунски мозък	116
7.6.1. Фенотипна характеристика на TNC в нормален маймунски мозък.	116
7.6.2. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален маймунски мозък	118
7.6.3. Фенотипна характеристика на GJA1 в нормален маймунски мозък	120
7.6.4. Фенотипна характеристика на CD38 в нормален маймунски мозък	122
7.7. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален човешки мозък.	123
8. НЕДОСТАТЪЦИ НА НАСТОЯЩОТО ПРОУЧВАНЕ	126
9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
10. ИЗВОДИ	129
11. СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	130
12. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДОКТОРАНТУРАТА	131
13. ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДОКТОРАНТУРАТА.	132
14. БИБЛИОГРАФИЯ	133
15. БЛАГОДАРНОСТИ	147

Посвещавам
на моята баба Марийка и
на моя скъп приятел
Пламен Костов (съседа Мариш)

1. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

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

Glut1	Glucose transporter 1
i.m.	intramuscular injection
i.v.	Intravenous
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IHC	Immunohistochemistry
ISH	In situ hybridisation
kDA	Kilodalton
Ki67	Marker of proliferation Kiel 67
Kif2A	Kinesin Family Member 2A
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MAX	MYC Associated Factor X
MCA	Middle cerebral artery
MCM2	Minichromosome Maintenance Complex Component 2
mRNA	Messenger RNA
NAADP	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NPC	Neural progenitor cell
O.C.T.	Optimal cutting temperature compound
OB	Olfactory bulb
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PK	Proteinase K Buffer
Prom1	Prominin-1
PSA-NCAM	Polysialylated-neural cell adhesion molecule
PVSVZ	Perivascular subventricular zone
qNSC	Quiescent Neuronal stem cell
RNA	Ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing

Roi	Region of interest
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCD5	Stearoyl-CoA desaturase 5
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SEL	Subependymal layer
SGZ	Subgranular zone
STR	Striatum
SVZ	Subventricular zone
TAPs	Transient Amplification Progenitors
TNC	Tenascin c
tRNA	Transport ribonucleic acid
TUC4	Turned On After Division
Tuj1	III beta-tubulin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
Wnt	Wingless
ZBTB20	Zinc Finger And BTB Domain Containing 20

2. УВОД

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

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

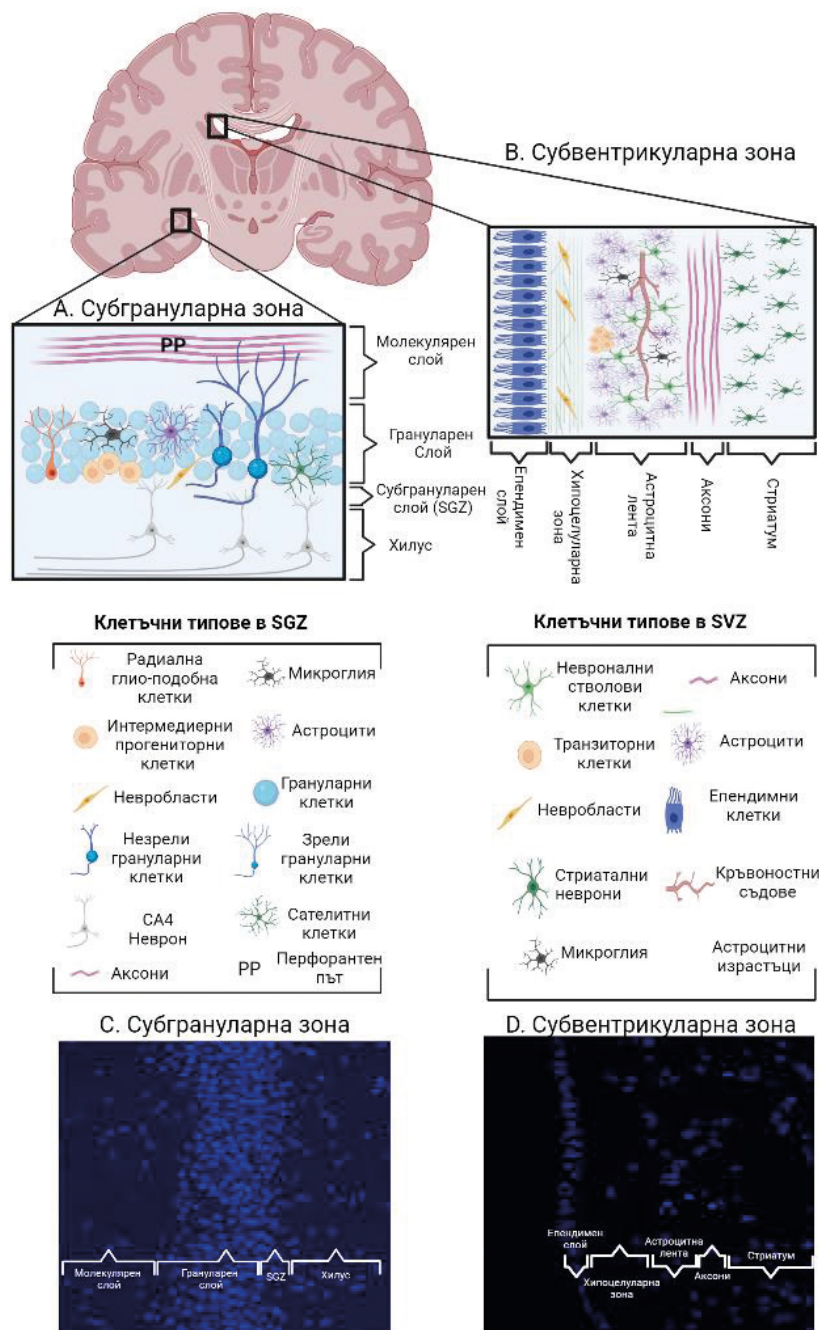
Настоящата дисертация представя количествен анализ на пролиферацията и диференциацията на неврални стволови клетки при възрастни примати. Резултатите както от фенотипа на не-човекоподобните примати, така и от хора може да доведе до откриване на по-ефективни начини за активиране на невроналната регенерация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

3. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

3.1. Невронални стволови клетки и концепция за неврогенеза

Стволовите клетки играят централна роля във възстановяването и поддържането на органната хомеостаза в тъканите, включително и в мозъка. Те са клас недиференцирани клетки, притежаващи способността да се самовъзпроизвеждат и да се диференцират във високоспециализирани органно-специфични дъщерни клетки. През последните 60 години редица научни данни (както от *in vivo*, така и *in vitro* изследвания) демонстрират при бозайници наличието в мозъчната тъкан на такива клетки дори и при възрастни индивиди, със запазена способност да се делят и да произвеждат функционални дъщерни клетки, които могат да се интегрират в невронни вериги^{1,2}. В мозъка на бозайници най-добре проучените зони, съдържащи стволови клетки, се намират в два региона: субвентрикуларната зона на латералния вентрикул (*subventricular zone*, SVZ) и субгранулната зона на *gyrus dentatus*, намираща се в хипокампалната формация (*subgranular zone*, SGZ)³⁻⁵. В допълнение бяха открити и други места с потенциал за произвеждане на неврони като амигдала, стената на трети вентрикул, стриатум и други⁶⁻⁸. Натрупаните литературни данни показват, че клетъчните субпопулации в най-голямата неврогенна ниша (фиг. 1B, D), SVZ, включват пет основни вида клетки: невронални стволови клетки (клетки тип B1), транзиторни амплификаторни клетки (TAPs, *Transit-amplifying cells* или клетки тип C), невробласти (клетки тип A), епендимни клетки (тип E) и паренхимни астроцити (тип B2)¹. Тип B1 клетки представляват астроцитна субпопулация мултипотентни клетки, способна да се самовъзпроизвежда (*self-renewal*) и да пролиферира¹². Невроналните стволови клетки, помещаващи се в тези зони, представляват специализирани астроцитни популации, намиращи се в специализирана среда или ниша, които приемат сигнали както от средата, така и при междуклетъчни взаимодействия и балансират състоянието си на активация или покой (от англ. *quiescence* – покой). След пролиферацията на този вид клетки се образуват TAPs, които са недиференцирани, но имат способността да се делят. След определен брой деления се превръщат в незрели прогениторни клетки, наречени невробласти (тип A)⁹⁻¹¹. Последните са незрели неврони, които мигрират на дълго разстояние по роstralния миграторен път (RMS, *rostral migratory stream*), достигайки до *bulbus olfactorius*, къде-

то се интегрират и функционират като интерневрони. Невроните в SGZ на хипокампа (фиг. 1A, C) произлизат от радиални глио-подобни клетки, които генерират интермедиерни прогенитори – клас недиференцирани клетки, способни да произведат незрели неврони (невробласти), които след кратка тангенциална миграция се интегрират като интерневрони в грануларния слой на gyrus dentatus (GD)⁴.



Фиг. 1: Устройство на основните неврогенни ниши при примати: SGZ и SVZ.

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

В. Устройство и клетъчен състав на субвентрикуларната зона (SVZ), разделена на 4 слоя: епендимен слой, гап зона, астроцитна панделка и преходна зона, включваща аксони и стриаталния паренхим. Схематично са представени и главните клетъчни субпопулации, изграждащи тези структури, включително и В1 астроцити, представляващи невроналните стволони клетки в тази зона.

С. Микрография с оцветяване за ядра (DAPI) на gyrus dentatus.

Могат да бъдат различени трите слоя на структурата (молекулярен, грануларен, субгрануларен (SGZ)).

Д. Микрография с оцветяване за ядра (DAPI) на SVZ. Могат да бъдат различени четирите слоя на структурата: епендимен слой, гап зона, астроцитна панделка и преходна зона.

3.2. Анатомия на субвентрикуларната зона при гризачи

Клетъчните популации, намиращи се в SVZ, са добре проучени при гризачи. Епендимните клетки (тип Е) представляват ресничести клетки, които облицоват стената на вентрикула и способстват за придвижването на цереброспиналната течност във вентрикуларната система. Епендимните клетки могат да се групират в две групи в зависимост от броя на ресничките по апикалната им повърхност: тип Е1 притежават множество цилии, а тип Е2 – само две^{9,13}. Дълго време се е смятало, че епендимните клетки са спящи или латентни стволони клетки, които се активират при увреда на ЦНС¹⁴. Нови транскриптомни изследвания показват обаче, че те са постмитотични и не притежават транскрипционни характеристики на стволони клетки¹⁵. Тези клетки експресират s100b, Nestin, CD133, CD24, Vimentin, FOXJ1 и други маркери, докато са негативни за EGFR (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), GFAP, GLAST, ASCL1 и други¹⁶.

При оцветяване на вентрикуларната повърхност могат да се забележат структури тип „вятърна мелница“ (от англ. pinwheel structure), образувани от тип Е и Тип В1 клетки. Тези структури са изградени от епендимни клетки, подредени в кръг около една В1 клетка. При диференцирано оцветяване на плазмалемата и цилиите може да се установи наличието на апикално разположена ресничка на В1 клетките, която е позитивна за GFAP. Същите клетки притежават и дълъг базален израстък, достигащ като крайно разширение до кръвоносен съд⁹. GFAP+ клетки също участват в изграждането и на глиалните канали, по които невробластите мигрират по хода на RMS.

Описаните невронални стволови клетки се наблюдават и при възрастни мишки, но при тях са в намален брой, но не за сметка на активираните невронални стволови клетки¹⁷. Това не оказва влияние върху общия брой на дялящите се стволови клетки, т.е. намаляване броя им за единица площ, тъй като процентът на активно дялящи се клетки се увеличава и поддържа определеното равновесие¹⁷.

Структурите тип „вятърна мелница“ могат да бъдат намерени само в предната част на латералния вентрикул и липсват в медиалната му стена, както и в третия вентрикул⁹.

С помощта на апикалния израстък, който е в пряк контакт с цереброспиналната течност, и базалния израстък, завършващ върху кръвоносен съд, невроналните стволови клетки получават разнообразни сигнали, влияещи върху поведението им⁹.

Невроналните стволови клетки в мозъка на бозайниците съществуват в няколко състояния, отразяващи различни етапи на активност, според които те се делят на активни (aNSCs) и „спящи“ (qNSCs). Докато първите пролиферират активно и са неврогенни, вторите са рядко дялящи се клетки с ограничени пролиферативни възможности. Всъщност и двете субпопулации са неврогенни, но се различават по своята кинетика. Интересно е, че при определени условия единият тип може да се превръща в другия и обратно. Веднъж активирани, qNSCs са високопролиферативни и показват определени различия във фенотипната си характеристика. След активирането си qNSCs се превръщат в aNSCs, които започват да експресират EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). qNSCs не експресират маркери за пролиферация като Ki67 (маркер, експресиращ се по време на G1 фазата на клетъчния цикъл). Друг начин за бележене на дялящи се клетки е апликация на BrdU, който е тимидинов аналог и се инкорпорира в ДНК по време на S-фазата на клетъчния цикъл. Известен период след приложението на BrdU, в зависимост от това, колко бързо се делят клетките, те могат да го разреждат и да не бъде засечен в тях. Ако клетките са бавно дялящи се, тогава чрез използване на антитяло, насочено срещу BrdU, те могат да бъдат визуализирани. Поради факта, че qNSCs се делят бавно, те ще задържат BrdU и ще са позитивни за него. qNSCs експресират и комбинация от маркерите GFAP⁺CD133⁺ при липса на експресия на EGFR, за разлика от aNSCs, които експресират и трите маркера¹⁸. Невроналните стволови клетки експресират различни молекулярни маркери. Проминин

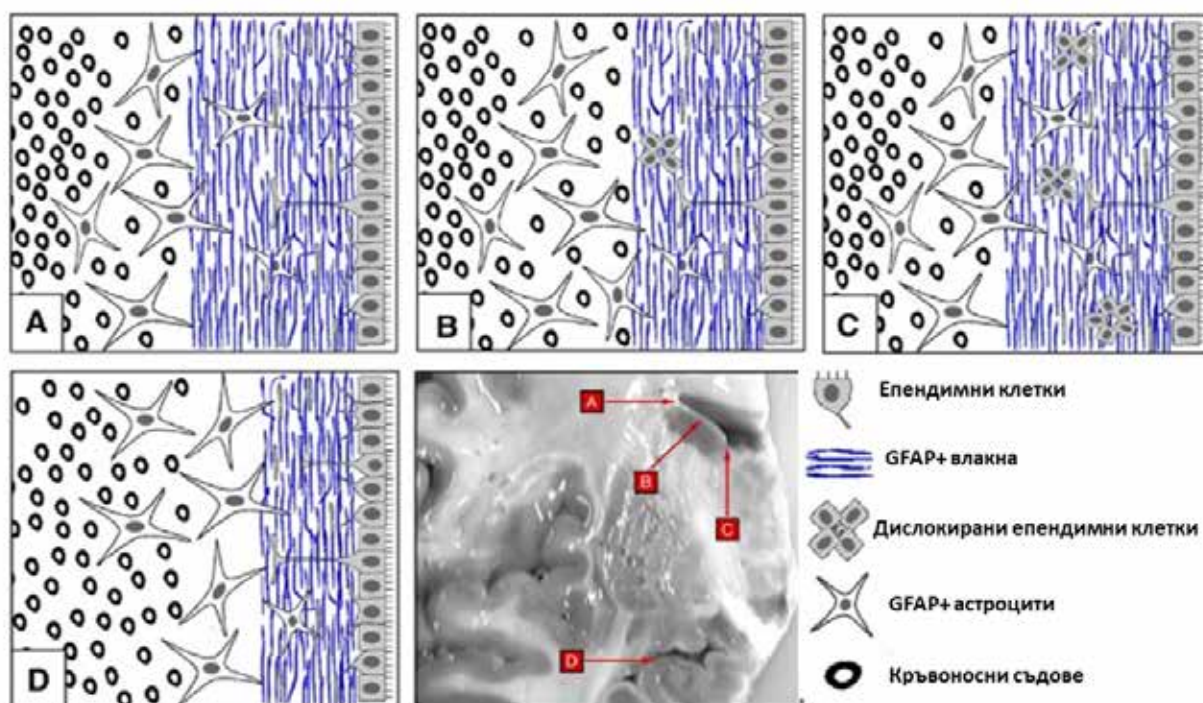
или CD133 е трансмембранен гликопротеин, експресиращ се в първичната цилия на невроналните прогенитори¹⁸. GFAP, Vimentin, Nestin са интермедиерни филаменти с характерна експресия не само в астроцити, но и в невронални стволови клетки.

В SVZ се наблюдава и богато сплетение от кръвоносни съдове. Голяма част от кръвоносните съдове се намират повърхностно и паралелно на епендимните клетки на дълбочина между 10 и 20 μm ¹⁹. Обикновено те са големи и прави, разполагат с по-малко разклонения, за разлика от кръвоносните съдове, намиращи се в неневрогенни зони като кората на крайния мозък²⁰. Друга съществена разлика е намалената скорост на кръвотока в кръвоносните съдове в SVZ¹⁹. Пролиферацията на отделните прогениторни клетки в тази зона е зависима от фактори, произлизащи от кръвоносните съдове в зоната. Скорошни данни показват, че ендотелните клетки в тази зона секретират фактори, стимулиращи самовъзпроизвеждането на невроналните стволови клетки, като в същото време инхибират тяхната диференциация^{21, 22}. Интересно е близкото разположение на делящите се стволови клетки и техните прогенитори до съдовото сплетение. Кръвоносните съдове в мозъка участват в изграждането на кръвно-мозъчната бариера, състояща се от три компонента: 1. Ендотелни клетки; 2. Перицити; 3. Крайни израстъци на астроцити (end-feet processes). В този регион съществуват определени различия в тази структура, изразяващи се в прекъсването ѝ на места и директния контакт на прогениторните клетки с фактори от кръвта²⁰. Невробластите също се намират в близки взаимоотношения с кръвоносните съдове, които играят важна роля както в доставянето на растежни фактори, така и в придвижването на тези клетки към RMS. Наличието на рецептор за $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ интегрин върху невроналните стволови клетки играе задържаща и анти-пролиферативна роля, като ги свързва с кръвоносните съдове. Блокирането на този рецептор води до промяна в тяхната позиция и пролиферация²³.

3.3. Особености на субвентрикуларната зона при примати

Субвентрикуларната зона е локализирана по протежение на латералния мозъчен вентрикул, като граничи с него и с nucleus caudatus. Тя представлява най-големият герминативен регион в мозъка на бозайниците и в нея се генерират интерневрони, предназначени на bulbus olfactorius (OB). Самата SVZ при приматите се изгражда от

4 слоя: епендимен слой (слой I), хипоцелуларна зона (Слой II), астроцитна лента (от англ. Astrocytic ribbon) (слой III) и транзиторен (преходен) слой (слой IV). Епендимният слой е изграден от един до няколко реда епендимни клетки, които отграничават латералния вентрикул от хипоцелуларната зона. Слой II представлява пространство с наличие на минимални количества миелин, единични клетки и плътна мрежа от GFAP⁺ (от англ. глиален фибриларен кисел протеин) израстъци. В него може да се наблюдават невробласти, които обаче не са организирани във верижки. Хипоцелуларната зона граничи със слой I и слой III. Слой III е изграден от същински GFAP⁺ невронални стволови клетки, като дебелината му варира в дорзо-вентрално направление (фиг. 2).



Фиг. 2: Структура на човешка субвентрикуларна зона. Може да се наблюдава различната структура в зависимост от разположението:

- A.** SVZ в дорзалната част на вентрикула; **B.** SVZ в средната част на вентрикула;
- C.** SVZ във вентралната част на вентрикула; **D.** SVZ в темпоралния рог на латералния вентрикул в близост до хипокампалната формация.

Долу вдясно – вид на клетките в използваните графики и снимка на човешки мозък с обозначените региони.

Адаптиран по Hinojosa et al., 2007

Според организацията и дебелината на слоевете субвентрикуларната зона може да бъде подразделена на четири типа: тип А, В, С и D. Тип А може да се наблюдава в дорзалната трета на SVZ, тип В в средната трета, а тип С във вентралната трета. Тип D е характерен единствено за SVZ, граничеща със слепоочния рог на страничното стомахче. Това разделение е въз основа на дебелината на гап зоната и астроцитните израстъци в нея, както и дебелината на астроцитната панделка. Тип А и С се характеризират с широка гап зона и дебел слой на астроцитните израстъци, намиращи се в нея. При тип В големината на гап зоната и дебелината на слоя астроцитни израстъци са по-малки.

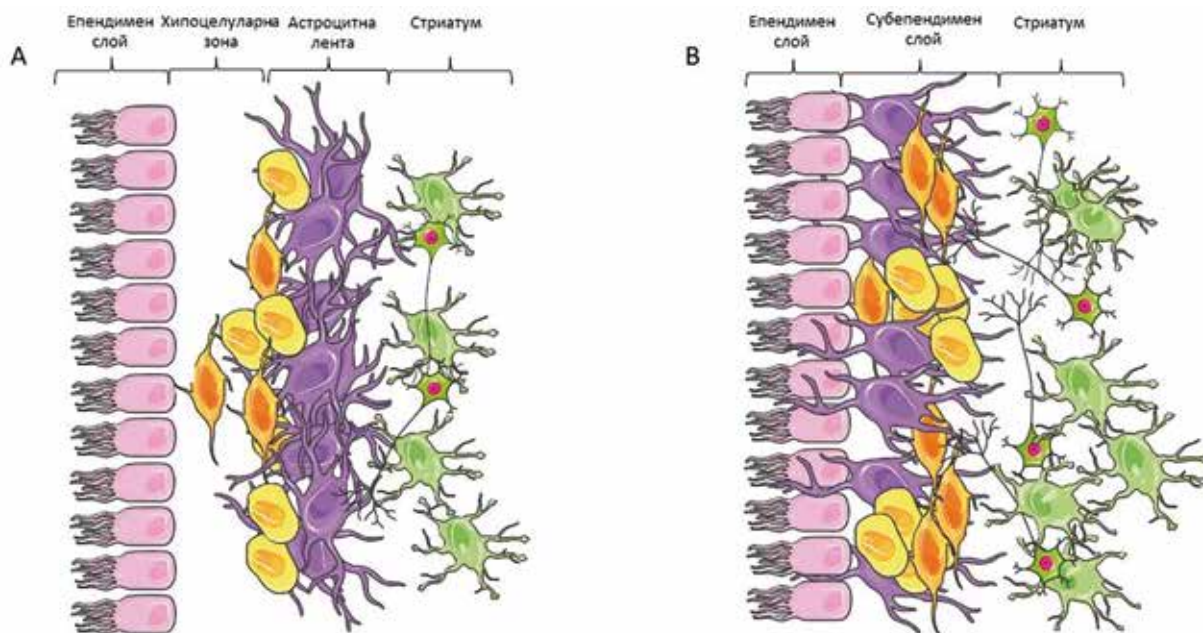
Слой III граничи със слой II и слой IV. Слой IV представлява преходна зона с латерално намаляване на количеството на астроцитите и увеличаване на стриаталните неврони и миелиновите влакна. Общата дебелина на четирите слоя възлиза на приблизително 100 μm .

Съществуват съществени разлики във функционално и анатомично отношение между човешката и мишата SVZ (Фиг. 3). От една страна, слой II на SVZ при мишка няма, а се наблюдава ясен контакт между стволите и епендимните клетки. От друга страна, броят на пролифериращите стволити клетки при хора е значително по-малък, отколкото при гризачи. Друга основна разлика, за която до момента няма единно мнение, е отсъствието или наличието на верижки от невробласти²⁴.

Клетките, намиращи се в астроцитната панделка при примати, експресират различни маркери, включително GFAP, GFAP-delta, Nestin, Vimentin^{25, 26}. GFAP-delta е специфична изоформа на протеина GFAP, която се кодира от алтернативни сплайсинг варианти и се експресира само в субпопулация от клетки, намираща се под *ria matter* на крайномозъчната кора, в субгрануларната зона на *gyrus dentatus* и в астроцитната панделка на SVZ. Клетките в астроцитната панделка на SVZ, експресиращи GFAP-delta, представляват вероятно невронални стволити клетки²⁶.

Проучванията, изследващи неврогенезата на примати, се фокусират предимно върху обикновена мармозетка (*Callithrix jacchus*), макак резус (*Macaca mulatta*), Явански (дългоопашат) макак (*Macaca fascicularis*) или човек (*Homo sapiens sapiens*). SVZ на възрастните примати съдържа мултипотентни, самообновяващи се NSCs^{1, 2, 27, 28}. NSCs бавно се делят и диференцират в бързо пролифериращи клетки, които генерират

невробласти. Данните за степента на неvroгенеза в SVZ на примати зависят от изследваните видове.



Фиг. 3: Сравнение на субвентрикуларната зона при примати и при гризачи.

А. Схематично представяне на субвентрикуларната зона при примати. Може да се забележи наличие на четири основни слоя: епендимен слой, който е в контакт с цереброспиналната течност, хипоцелуларна зона (гап зона), астроцитна панделка, съдържаща невронални стволови клетки, и транзиторна зона с неясна граница, преобладаваща в стриатум. **В.** Схематично представяне на субвентрикуларната зона при мишки. Може да се забележи отсъствието на ясно дефинираните при примати четири зони и най-вече отсъствието на гап зона.

Функционалното изследване за поведението (пролиферация и способност за диференциация в различни клетъчни типове) на невроналните стволови клетки, осъществени чрез *in vitro* култивиране (невросфери), показва, че NSCs/NPCs от предната SVZ на хора от всички възрасти могат да генерират витални невросфери, които при диференциране съдържат астроцити, неврони и олигодендроцити^{1,2}. Данните за различните състояния на NSCs/прогениторните клетки, пребиваващи в SVZ-нишата на примати, и за траекторията им на диференциация са силно ограничени. В сравнение, транскриптомният анализ в мишите SVZ и SGZ разглежда моделите на генна експресия, свързани с траекторията на диференциация на тези клетки, включително междин-

ни състояния между тях, което силно улеснява изучаването на биологията на NSCs при гризачи²⁹⁻³². В този аспект липсата на подробна информация за състоянието на стволовите клетки при примати създава затруднения при изясняване на техните интимни характеристики и свойства. Присъствието и нивата на експресия на GFAP-delta при хора остават стабилни в SVZ по време на стареене²⁶. Van den Berge et al. показват, че получените от SVZ пролиферативни и мултипотентни невросфери съдържат GFAP-delta⁺ NSCs³³. Същата група показва, че NSCs в SVZ са CD271⁺ – експресия, ограничена само до GFAP-delta⁺ клетки³⁴. Чрез изолиране и профилиране на CD271⁺ клетки посредством scRNA-seq Hol et al. показват, че тези прогениторни клетки в SVZ при възрастни хора имат транскриптомен характер на късни олигодендрцитни прогенитори^{35, 36}.

Някои изследвания поставят под въпрос въобще наличието на неврогенеза в SVZ при възрастни хора³⁷⁻⁴¹. Повечето такива изследвания се извършват с помощта на конвенционални методи като имунохистохимия. Интересно е, че често използваният маркер на NSCs при гризачи CD133 (Prominin-1) не се експресира в SVZ на възрастни хора и маймуни^{42, 43} (monkey-niche.org)⁴⁴.

Оценката на пролиферацията в герминативните области се извършва чрез имунохистохимично изтъкване на маркери за пролиферация (Ki67, PCNA, MCM2 и други). В множество проучвания Ki67^{28, 33, 38, 45, 46} и PCNA⁴⁷ показват наличието на пролифериращи клетки в човешката SVZ³⁸. Както се посочва от Dennis et al., мнозинството пролифериращи клетки в неврогенните зони на мозъка при възрастни индивиди са микроглиални, експресиращи маркера Iba1⁴⁶. Поредица от проучвания, изследващи маркера за пролиферация PCNA в здрави и засегнати от болест на Хънтингтън човешки мозъци, представят доказателства за големи количества пролифериращи клетки в SVZ^{48, 49}. Като използва имунооцветяване за NSCs/астроцити и невробласти (PSA-NCAM, β -III-tubulin и DCX), същата група показва увеличение на неврогенезата при пациенти с Хънтингтън, но резултатите не са сравнени с оцветявания при хора без наличие на заболяването⁴⁸. Групата също така демонстрира PCNA⁺ епендимни клетки¹⁵ – клетъчен тип, който според проучвания при гризачи не експресира маркери за NSCs/прогениторни клетки и не е пролиферативен^{50, 51}. Нашето мнение въз основа на тези факти, получени с използването на маркера PCNA, е, че оцветяването най-вероятно се дължи на неспецифично свързване¹⁵.

Невробласти в SVZ при хората се наблюдават през първия месец от живота и количеството им бързо намалява с възрастта^{37, 50}. В SVZ на възрастна маймуна данните сочат малко количество генерирани нови, незрели неврони (невробласти).^{1, 38, 40, 45, 51, 5}

Предполага се, че новообразуваните в SVZ клетки могат да се пренасочат и интегрират в структури в непосредствена близост до зоната^{53, 54}. В проучване, прилагашо комбинация от различни методи (имунохистохимия, EdU маркиране, диференцирана оценка на липофусциновия товар, Western blot (WB) и ¹⁴C датирание), Ernst et al. показват стриатална интеграция на неврони, произлезли от SVZ. Това наблюдение е в съответствие с доклади от протеинов анализ чрез WB, показващи наличието на DCX и PSA-NCAM в стриатума⁵⁵. Wang et al. показват, че интерневроните в стриатума на резус маймуни и хора произхождат от медиалното ганглийно възвишение (MGE) и образуването им е ограничено само до ембрионалните етапи на развитие⁴⁰.

При възрастни хора наличието на RMS или подобни на RMS структури все още не е твърдо установено. Първоначален доклад от Sanaï et al. показва, че за разлика от гризачите, единични невробласти, но не и верижки от невробласти (RMS), могат да бъдат наблюдавани в SVZ и RMS в мозъка на възрастен човек. Същата група потвърди откритието си с помощта на електронна микроскопия¹. В допълнение се показва присъствие само на единични DCX⁺ и Ki67⁺ клетки в RMS на възрастни хора⁴⁶. В своето проучване Wang и колеги потвърждават горните открития. Освен това те съобщават, че всички DCX⁺ клетки са положителни за PSA-NCAM и Tuj1, но не всички PSA-NCAM⁺ и Tuj1⁺ са положителни за DCX. Тези наблюдения предполагат, че DCX е по-надежден маркер за невробласти от другите два⁴⁵. Противно на това, по-късно изследване на Curtis et al. демонстрира структура, подобна на RMS, включваща група от клетки, мигриращи първо вентрално и след това рострално, като по този начин образуват „низходящо краче на RMS“ и „рострално краче на RMS“. Тези пролифериращи клетки в SVZ и структурата, подобна на RMS, са положителни за невробластните маркери PSA-NCAM и β -III-tubulin⁵⁶. Трябва да се отбележи, че няма консенсус по отношение на специфичността на PCNA оцветяването на пролифериращите клетки. Всъщност съществуват голям брой доказателства, че PCNA не е толкова специфичен маркер за пролиферативни явления в сравнение с Ki67⁵⁷⁻⁵⁹. Скорешни изследвания, фокусирани върху хипокампалната неврогенеза, показват, че PCNA и Ki67 могат да

бъдат взаимнозаменяемо използвани⁶⁰. Струва си да се спомене, че наличието на клетъчни субпопулации, идентифицирани при гризачи, като aNSCs и TAPs, оценени по експресията на EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), са с неясна характеристика и намаляват с времето при хората³⁷.

3.4. Активиране на неврогенеза в резултат на мозъчна исхемия

Мозъчната исхемия е често срещано състояние в световен мащаб. Всяка година приблизително 795 000 души в САЩ са засегнати от мозъчен инсулт, като приблизително 80–87% от горепосочените цифри са в резултат на исхемичен инсулт^{61, 62}. Към 2019 г. в Европа случаите на новодиагностицирани пациенти с поставена диагноза инсулт са възлизили на 2.1 милиона, а тези на смърт, причинена от заболяването, възлизат на 438 000 души към 2017 г.^{63, 64}. Икономическото влияние на тази група заболявания за 2014–2015 г. в САЩ възлиза на \$351.3 милиарда или приблизително 14% от всички здравни разходи в страната за споменатия период⁶⁵, а от друга страна, разходите за лечение в Европа възлизат на €60 милиарда към 2017 г.⁶³ Исхемичният мозъчен инсулт се причинява от тромбоемболично блокиране на голям церебрален кръвоносен съд или негов клон⁶². Оклузията на церебрален кръвоносен съд предизвиква кръвна и кислородна недостатъчност, което патолофизиологично протича в три фази: остра, подостра и хронична. По време на острата фаза, която трае от минути до първите няколко часа от оклузията на кръвоносния съд, патолофизиологичната каскада включва изчерпване на аденозин трифосфат (АТФ), образуване на реактивни кислородни радикали, натрупване на екстрацелуларен калций, възпалителни промени, отделяне на глутамат и др.⁶². Впоследствие и в подострата фаза се наблюдава активация на имунни клетки, включително и настъпване на мозъчен оток, автофагия и апоптоза на невронални клетки⁶⁶. Подострата фаза продължава от часове до седмици. В хроничната фаза, траеща от месеци до години, се наблюдава стабилизация на патолофизиологичните процеси, но и продължаващо възпаление и пропускливост на кръвно-мозъчната бариера⁶⁶. В самата зона на инфаркта се наблюдават два основни региона на увреда: исхемично огнище (от англ. ischemic core) и преходна зона (пенумбра). В исхемичното огнище кръвотокът е нисък до липсващ, което води до клетъчна увреда

и смърт. В областта на пенумбрата кръвотокът може да осигури минималните хранителни вещества и енергия, което предотвратява клетъчната увреда, а ако кръвотокът се възобнови навреме, е възможно възстановяване на мозъчната тъкан⁶⁷.

Лечението на исхемичния мозъчен инсулт се свежда до два подхода: фармакологична тромболиза или механично реканализиране на засегнатия съд. Фармакологичното третиране на пациенти с остър исхемичен мозъчен инсулт се осъществява само чрез интравенозна и/или интраартериална тромболиза с рекомбинантен тъканен плазминогенов активатор (rtPA) в рамките на първите 4.5 часа от началото на симптомите при наличие на строго определени индикации и отсъствие на контраиндикации⁶⁷⁻⁶⁹. Механичното реканализиране представлява ендоваскуларна интракраниална тромбектомия чрез реперфузионен катетър, свързан към аспирационна система, комбинирана със или без тромболитична терапия⁷⁰.

Множество автори описват активиране на пролиферацията на клетки, намиращи се в неврогенните ниши, в дните след експериментално индуциран мозъчен инфаркт⁷¹⁻⁷³. Съществуват множество *in vivo* и *in vitro* експериментални модели на мозъчна исхемия. За осъществяване на *in vitro* моделите се използват главно клетъчни култури, поставени в условия на кислороден недоимък. Този тип експерименти са извън обхвата на настоящата работа и няма да бъдат коментирани по-детайлно. *In vivo* моделите използват главно два животински модела за симулиране на исхемична увреда. Първият представлява локална (фокална) исхемия, причиняваща увреда унилатерално на територията на даден церебрален кръвоносен съд, най-често *arteria cerebri media* (MCA). Увредата, най-често на стриатума и кортекса, се причинява чрез лигиране или оклузиране на MCA чрез филаменти/лигатури, фототромбоза или използването на ендотелин-1 (локална вазоконстрикция).

При втория подход на билатерална (глобална) транзиторна хипоперфузия се осъществява клампиране на големи кръвоносни съдове (вертебрални, каротидни или др.) за определен период от време, което отново уврежда селективно определени региони и клетъчни субпопулации^{62, 74, 75}.

Увеличена пролиферация на прогениторни клетки като следствие от постисхемично фокално увреждане е описана при гризачи от различни възрастови групи⁷³. Такива данни има и при други бозайници, включително и маймуни^{71, 72, 75, 76}.

Пролиферацията на прогениторните клетки може да бъде изследвана чрез методи за специфично бележене на делящи се клетки post-mortem: BrdU, EdU, Ki67, PCNA и др.^{71, 72, 75, 76}.

В по-голямата част от случаите след индуциране на инсулта (глобален или фокален) животното приема ДНК аналог като 5-bromo-2'-deoxyuridine или 5-Iodo-2'-deoxyuridine (BrdU или IdU), който се инкорпорира в ДНК по време на S-фазата на клетъчния цикъл. Тъй като и двете субстанции са тимидинови аналози, те заместват нуклеотидната база тимин по време на новосинтезирането на ДНК. По този начин клетките могат да бъдат белязани с имунохистохимични методики, използващи специфични антитела, или визуализиращи системи, насочени съответно към BrdU или IdU. В зависимост от периода на апликация на молекулите могат да се наблюдават прогениторни клетки, тяхното потомство или да се проследи динамиката на клетъчния цикъл^{77, 78}.

Подобен модел на глобална исхемия при нечовекоподобни маймуни (*Macaca mulatta*) индуцира образуване на нови клетки с прогениторен характер, експресиращи *Mushashi*, *Nestin*, β -III-tubulin и BrdU, в предната част на SVZ (anterior SVZ, aSVZ)⁷². По отношение на SGZ повишаването на пролиферацията на невроналните прогенитори, експресиращи различни клетъчни маркери като *Musashi*, BrdU, Ki67, *Nestin* и TUC4, е с пик на деветия ден след експерименталното индуциране на глобална исхемия⁷¹.

Други данни от подобен модел на увреда при гризачи показват, че пролиферацията на клетки, намиращи се в SVZ, се увеличава драстично спрямо тази при контролни животни. Времето за пролиферация на клетките в SVZ при нормални условия обикновено е в порядъка на 14–18.6 часа. Исхемичното увреждане скъсява дължината на клетъчния цикъл от 19 часа на 15.3 часа, което най-вероятно се дължи на промяна в G1 фазата⁷⁹.

Образуването на невронални прогенитори (невробласти) в SVZ на мишия мозък е последвано от миграцията им по протежението на RMS към ОБ, където се интегрират като интерневрони. За разлика от мишката, въпреки голямото количество пролифериращи клетки (BrdU+) в региона, отговарящ на RMS („вентрално изтлачване на SVZ“) при маймуна, не се открива фенотип на мигриращи невробласти⁷². Въпреки че

неврогенезата е засилена след исхемична увреда, редица автори показват, че пролиферацията на прогениторни клетки не е достатъчна за възстановяване на настъпилото увреждане. В допълнение, затишването на неврогенезата с възрастта не е резултат от увеличена апоптоза на пролифериращите клетки, а от цялостно намаляване на тяхната пролиферация⁷³.

Новите модели за терапия на исхемичния мозъчен инсулт се фокусират главно върху индуцирането на неврогенеза в пенумбрата на инфаркта чрез използването на ендогенни и/или екзогенни стволови клетки.

Трябва да се отбележи, че след настъпване на исхемичното увреждане NSCs преминават през четири стадия: пролиферация, миграция на невробластните клетки и диференциация в зрели неврони и синаптична интеграция. Всеки от тези процеси се повлиява от различни фактори, влияещи върху NSCs от съответния стадий. Исхемичното увреждане причинява скъсяване на клетъчния цикъл, увеличено повторно влизане в него и скъсяване на G1 фазата⁸⁰. Също така различни ендогенно апликирани в SVZ вещества като CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) влияят върху пролиферацията на тип С клетки, като индуцират експресията на FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2)^{81, 82}.

Новообразуваните след исхемичното увреждане невробласти се насочват към засегнатия регион. Този процес се влияе от различни хемокини като SDF-1/CXCR4 (stromal cell-derived factor-1 α /CXC chemokine receptor-4), отделени от мястото на увреждане⁸². Трябва да се отбележи, че редица химични и механични фактори блокират миграцията на невробластите, например като образуването на цикатрикс. Върху таксиса на невробластите влияние оказва и архитектурата на кръвоносната мрежа, по която те мигрират. След възникване на исхемичното увреждане се наблюдава и образуване на нови кръвоносни съдове (ангиогенеза), по които новообразуваните незрели неврони се придвиждат към увредения паренхим⁸³.

След исхемично увреждане при гризачи се наблюдава засилване на диференциацията на NSCs. Ефекти като увеличаване на експресията на FGFG1, броя на невробластите, позитивни за DCX, PSA-NCAM и Mash1, маркиращ тип С клетки, са резултат от активирането на $\alpha 7$ никотинов рецептор⁸⁴.

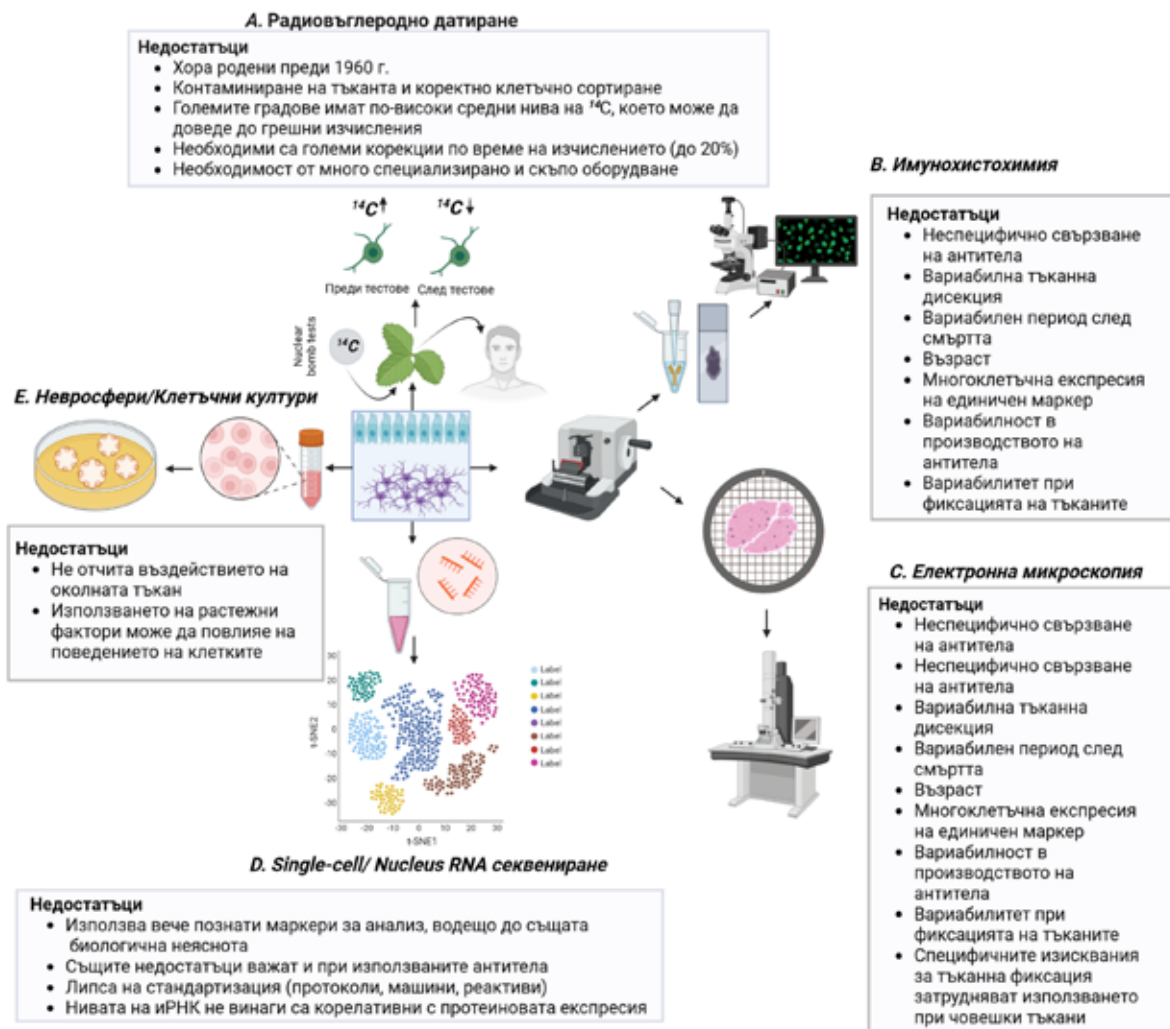
3.5. Промяна на транскриптома в SVZ след мозъчна исхемия

Флуоресцентно активирано сортиране на позитивни за GLAST и Prom1 невронални стволови клетки след транзиторна билатерална каротидна оклузия при възрастни мишки и последващ транскриптомен анализ показва преход на qNSCs към активиране.

Транскриптомен анализ на SVZ на макак след глобална исхемия доказва повишена експресия на гени, характерни за qNSCs, и понижена транскрипция на гени от профила на aNSCs^{29-32, 43}. Резултатите показват също, че сред диференциално експресираните гени има такива, характерни за транскриптомния профил на астроцити и олигодендроцитни прекурсорни клетки⁴³. Някои от гените с повишена експресия в SVZ на макак преди това не са документирани в невrogenните ниши на други бозайници: SCD5, APLNR, MAX, LGR5, ZBTB20, SCD5, KIF2A⁴³. SCD5 (стеароил-CoA десатураза 5) потиска клетъчната пролиферация чрез взаимодействие със сигнализирането на EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)⁸⁵. LGR5 и ZBTB16 са гени, свързани със стволовостта в други ниши, включително хемopoетичната и чревната⁸⁶⁻⁸⁸. Друг пример е APLNR (Apelin receptor, APJ), който е трансмембранен рецептор с важни функции в организма. В ЦНС може да участва в различни сигнални каскади, включително регулиране на кръвното налягане, клетъчна пролиферация, хомеостаза на вътрешната течна среда, регулация на апетита и други⁸⁹. Освен това лигандът за рецептора показва защитен ефект при някои неврологични и психиатрични заболявания, включително исхемичен мозъчен инсулт, епилепсия, болест на Паркинсон и Алцхаймер, и участва в патофизиологията на glioblastoma multiforme⁸⁹⁻¹⁰². Лигандът Apelin се секретира от ендотела на кръвоносните съдове в непосредствена близост до стволовите клетки на глиобластома, където участва в самообновяването на стволовите клетки^{91, 92}. Множество проучвания показват възможността glioblastoma multiforme да произлиза от клетка с произход от SVZ, което е в съответствие с доказателствата за наличието на невронални стволови клетки както в маймунската, така и в човешката SVZ^{35, 36, 43, 103, 104}.

3.6. Начини за изследване на неврогенезата

Начините за изследване на процесите на неврогенеза включват молекулярно-биологични, хистохимични и транскриптомни методи, които дават важна информация както за наличието на протеини от интерес (WB, ИНС), така и за наличието и количеството на mRNA, измерени с помощта на транскриптомни (RNA-seq) и хибридизационни техники (in situ hybridization, ISH) (Фиг. 4).



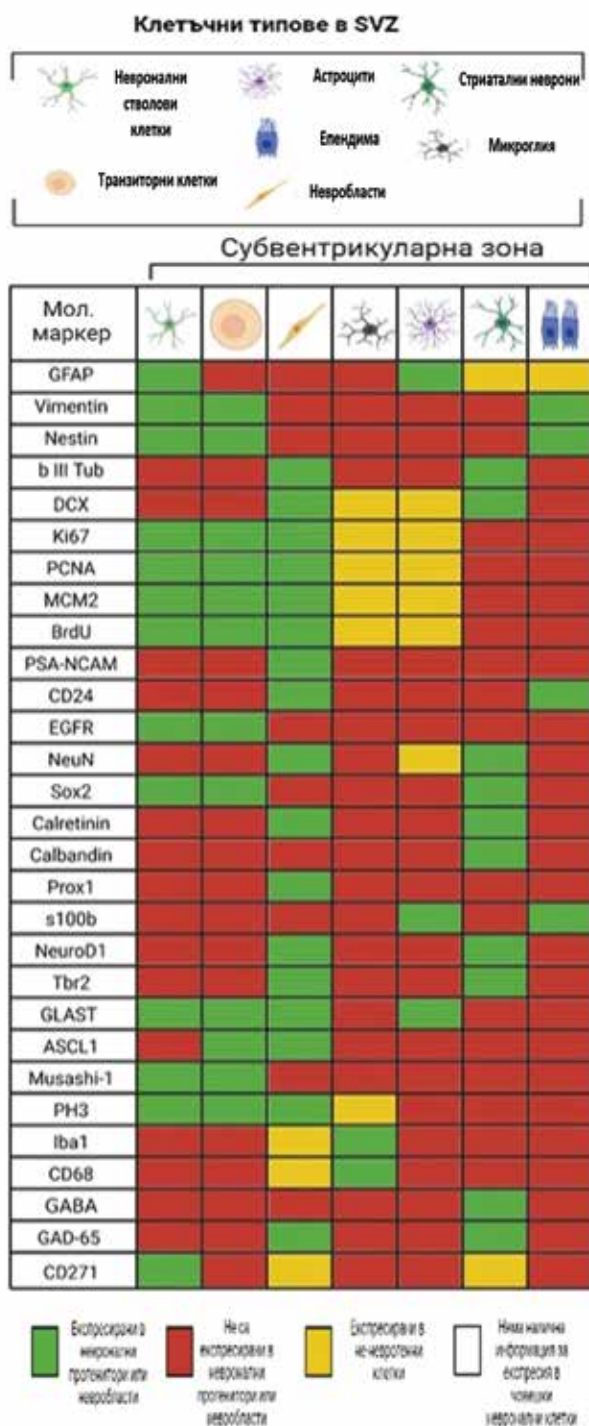
Фиг. 4: Основни методи за изучаване на процесите

на неврогенеза и техните недостатъци: **A.** Датиране с помощта на ^{14}C ;

B. Имунохистохимия; **C.** Електронна микроскопия; **D.** RNA-seq;

E. Клетъчни култури.

Имунохистохимията е полезна техника, която предоставя ясна пространствена и морфологична информация за протеиновата експресия. Важно е, че успехът на анализа се определя не само от количеството на експресия на протеина, но и как е валидиран и интерпретиран.



Фиг. 5: Основни имунохистохимични маркери, използвани в изучаването на процеса на неврогенеза в субвентрикуларната зона. На фигурата са представени наличието или липсата на експресия в различни видове клетки, намиращи се в SVZ.

Маркерите, използвани за изследване на неврогенезата при възрастни, не са специфични само и единствено за един клетъчен тип (Фиг. 5). Например DCX може да се експресира не само от невробласти, но и от астроцити или от микроглия^{105, 106}. Последното може да се дължи на фагоцитоза на незрели неврони¹⁰⁵. Дори в случай, че маркерите са с висока специфичност към една популация от клетки, това не изключва експресията в други видове клетки. Например един от най-надеждните маркери за астроглия, GFAP, може да маркира NeuN⁺ клетки¹⁰⁷. Оцветяването за BrdU също трябва да се тълкува с повишено внимание, тъй като могат да бъдат маркирани и апоптотични клетки^{71, 76}. Друга особеност е, че специфичността на антигена не е абсолютна, а зависи от много фактори, включително региона на интерес, изследваните видове, етапа на развитие и използваните методи и други¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Валидирането на използваните антитела не трябва да се ограничава само до положителни и отрицателни контроли, а да включва изчерпателна гама от техники за валидиране, включително WB, контроли за абсорбция на антитела, валидиране с второ антитяло, корелация с ISH или RT-PCR, валидиране с гени и протеинова експресия бази данни¹¹¹.

Интерпретацията на резултатите трябва да се прави само от добре обучен специалист. Както и ИНС, нововъзникващите нови транскриптомни техники също идват с недостатъци. Техниките за секвениране на РНК (RNA-seq) се използват като инструменти с висока производителност за генна експресия. Използването на различни протоколи, машини, реагенти и липсата на стандартизация обаче често водят до противоречиви резултати¹¹². Освен това нивата на иРНК (анализ на генната експресия), измерени с транскриптомен анализ или чрез *in situ* хибридизация (ISH), невинаги корелират с експресията на протеина, което създава трудности при анализирането на данни само чрез експресията на иРНК¹¹³. Друго важно ограничение на транскриптомните техники е липсата на пространствена разделителна способност¹¹².

В заключение, въпреки усиленото образуване на нови клетки в неврогенните зони и тяхната миграция, това е недостатъчно за възстановяване на последствията от исхемичното увреждане. Този факт насочва към изследването на средства, целящи намаляване на размера на увреда в зоната на исхемия, стимулиране на стволово-клетъчната пролиферация и/или намаляване на апоптозата на пролифериращите клетки и други новогенерирани и мигриращи клетки⁷³.

4. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

4.1. Цел

Мозъчната исхемия е често срещано заболяване, водещо до инвалидизиране или смърт в глобален мащаб. Индуцираната от исхемия неврогенеза е недобре разбран процес, което възпрепятства възможностите за ендогенното или екзогенното увеличаване на неврогенезата и последващата интеграция на новообразуваните неврони. Поради различията в цитоархитектурата и молекулярните механизми между гризачи и хора и поради близката родствена връзка между не-човекоподобните примати и хората последните са подходящ вид за изследване на процесите на неврогенеза. Скоросни транскриптомни проучвания при макак, подложен на глобална исхемия, показват наличие на 541 гени с повишена експресия и на 488 с понижена експресия спрямо контролна маймуна¹¹⁴. От всички 541 гена с повишена експресия за 150 от тях са направени *in situ* хибридизационни оцветявания, публикувани в отворената база данни monkey-niche.org.

В първата част на настоящата дисертация ще се опитаме да открием гени със значителна промяна в основните компоненти на стволово-клетъчната ниша в предния рог на латералния вентрикул (aSVZ). В допълнение ще се опитаме да направим сравнение на степента на експресия на избраните гени между исхемичното и контролното състояние.

Основните данни по отношение на пространственото позициониране на невроналните стволови клетки и тяхното потомство са получени при изследвания при мишки, докато такива данни липсват за не-човекоподобни маймуни. Във втората част на настоящата дисертация ще се опитаме да отговорим на въпроса за пространствената локализация за избраните от нас гени, като в допълнение ще сравним получените данни с други два бозайнически вида – *Mus musculus* и *Callithrix jacchus*. Поради факта, че генната експресия се променя след исхемия, за сравнителния анализ ще бъдат използвани контролни *in situ* хибридизационни оцветявания на *Macaca fuscata* и публично достъпни *in situ* хибридизационни оцветявания на *Mus musculus* (ISH Data: Allen Brain Atlas: Mouse Brain (brain-map.org)) и *Callithrix jacchus* (Marmoset Gene Atlas (brainminds.jp)).

За да разберем в детайли изучаваните от нас гени, в последната част на настоящата дисертация ще бъде направена молекулярна (фенотипна) характеристика на избраните от нас гени. Отново, за да избегнем промени в генетичната програма, флуоресцентните *in situ* хибридизационни оцветявания в комбинация с познати клетъчни маркери ще бъдат направени върху контролни макакски мозъци.

Поради възможността за фармакологично активиране или блокиране на апеленергичната системата, както и наличието на литературни данни за участието на APLNR/APLN систе в редица физиологични и патофизиологични състояния ще се опитаме да отговорим на въпроса в кои клетки се експресират двата компонента на апелинергичната система.

4.2. Задачи

1. Изследване на гените, налични в отворената базата данни www.monkey-niche.org, представяща генната експресия в приматната неврогенна ниша, преди и след мозъчна исхемия
2. Селекция на потенциални кандидат гени с предполагаема експресия в стволови и/или прогениторни клетки и генериране на сонди за *in situ* хибридизация
3. Изследване експресията на избраните гени *in situ* по протежение на rostro-каудалната ос на латералния вентрикул и сравняване техната експресия при други видове бозайници
4. Флуоресцентна *in situ* хибридизация за избраните гени в комбинация с имунохистохимия с цел установяване на клетъчните популации, експресиращи тези гени при примати при нормални условия
5. Фенотипна характеристика на един от избраните гени, апелинов рецептор, в приматната неврогенна ниша на нормален човешки мозък.

5. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

5.1. Селектиране на гени за фенотипен анализ

За селекцията на гени с повишена експресия в предната субвентрикуларна зона в норма и след исхемично увреждане беше използвана свободната дигитална база данни *monkey-niche.org*, включваща 150 гена, функционално свързани със стволово-клетъчната биология⁴³.

За да вникнем по-дълбоко в клетъчната характеристика на публикуваните там гени, ги прегледахме за наличие на интересна характеристика на експресия и локация. От всички 150 гена избрахме четири, показващи засилена експресия след исхемична увреда, локализирани и асоциирани с един или повече компонента на стволово-клетъчната зона (кръвоносни съдове, експресия в епендимния слой или силна експресия в субependимния слой). Изборът на гените беше направен чрез визуална оценка на генната експресия в зоната на интерес. Генната експресия в три региона при контроли и след исхемично увреждане беше анотирана по следния начин: Силна експресия беше обозначена с „+++“, средна експресия с „++“, ниска с „+“, а липса на експресия с „-“. Така нашият избор се сведе до гените: APLNR (Apelin Receptor), CD38 (Cluster of Differentiation 38), GJA1 (Gap Junction Alpha-1 protein) и TNC (Tenascin-C). Важно е да се отбележи, че маркери като CD133 (Prominin-1), рутинно използвани за откриване на стволови клетки в субвентрикуларната зона при мишка^{18, 115}, не се откриват при маймуна (PROM1 (CD133) (*monkey-niche.org*). Интересно е също така, че CD133 е фактор, който участва в сигналния път Wnt/beta-catenin и предпазва b-catenin от деградация, а липсата на експресия води до променена пролиферация и склонност към остаряване на клетката (от англ. Senescence)¹¹⁶.

5.2. Експериментални животни и човешки тъкани

За целите на нашето проучване бяха използвани седем броя възрастни японски макаци (*Macaca fuscata*), отнасящи се към семейство Коткоподобни маймуни (Cercopithecidae), първоразряд Тесноноси маймуни (Catarrhini), наречени още „маймуни на Стария свят“ (Old World monkeys): 3 контролни животни (1 мъжка и 2 жен-

ски) и 3 исхемични (1 мъжка и 2 женски) на възраст от 5–9 години, което отговаря на полово зрели млади индивиди с тегло към момента на изследването от 7–10 кг. Маймуните са отглеждани в климатизирани клетки със свободен достъп до вода и храна.

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

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

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

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

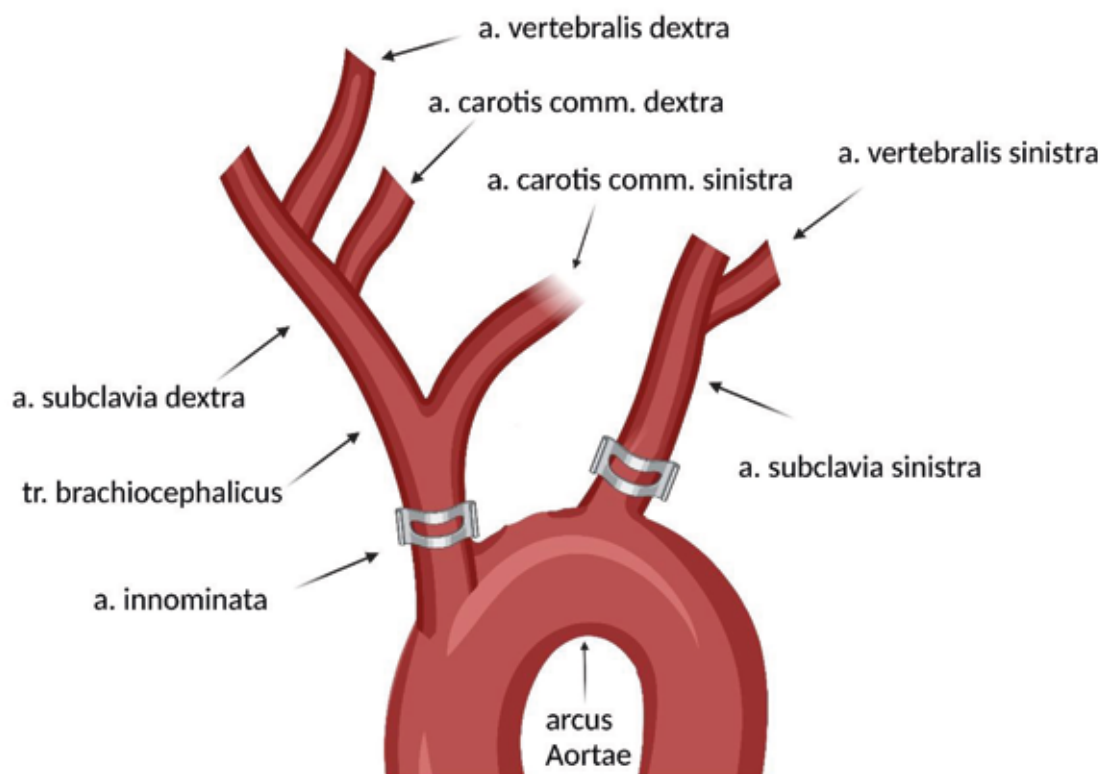
Всички мозъчни материали са събрани по време на рутинна аутопсия, проведена в *post-mortem* интервал, по-кратък от 24 часа, на пациенти без следи от патологични мозъчни изменения и липса на невро-психиатрична анамнеза.

5.3. Хирургични процедури

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

на операцията телесната температура на животните беше поддържана в рамките на $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Хирургичната процедура, свързана с глобалната исхемия, беше извършена в стерилни хирургични условия в следната последователност: предна срединна торакотомия, отпрепарирание на кожа и подкожие, прерязване на стернума, отпрепарирание на меките тъкани и визуализация на *a. subclavia sinistra* и *truncus brachiocephalicus* (фиг. 6).



Фиг. 6: Експериментална процедура за индуциране на глобална исхемия при маймуни: със сиво са представени клампите и тяхната позиция върху артериалните кръвоносни съдове (*a. subclavia sinistra* и *truncus brachiocephalicus/a. innominata*).

С модификации по ¹¹⁷

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

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

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

5.4. Обработка на тъканите

Мозъците бяха екстрахираны от черепната кухина и директно замразени в течен азот. Тъканите от експерименталните животни бяха съхранявани на температура от -80°C . За целите на FISH и ИНС при част от тъканите, съдържащи aSVZ и n. caudatus, бяха дисецирани блокчета с размери 2×2 см и впоследствие поставени на -80°C в O.C.T. (Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) Compound, Sakura, USA) за едно денонощие. Замразените препарати бяха нарязани на криостатен микротом (Leica CM3050S) на тъканни срези с дебелина 25 μm , които впоследствие бяха фиксирани, ацетилирани и дехидратирани, както следва: фиксация на препаратите с 4% разтвор на параформалдехид за 25 минути, последвана от изплакване с 0.9% NaCl два пъти за 2 минути. Ацетилирането беше извършено с 400 ml разтвор на Трис буфер, оцетна киселина и ЕДТА (TEA буфер). Разтворът беше разбъркван постоянно с магнитна бъркалка. Към него беше добавен 1 ml ацетанхидрид. Препаратите бяха инкубирани в разтвора 2 пъти по 5 минути със смяна на разтвора. След това препаратите бяха измити в PBS за 2 минути и в 0.9% NaCl за 2 минути. Последва дехидратация във възходяща алкохолна редица 30%, 50%, 70%, 80%, 95% и 2x100% (2 минути за всеки разтвор). Препаратите бяха изсушени за 3 минути на 30°C . След тази процедура стъклата с препаратите бяха затворени в кутии за дългосрочно съхранение на -80°C .

5.5. In situ хибридизационни оцветявания (колориметрични и флуоресцентни)

5.5.1. Изолация на РНК

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

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

Към микроепруветка с 50 mg тъканни парчета беше добавен 600 µl RLT буфер и тъканта беше хомогенизирана с помощта на тъканен хомогенизатор (Kinematica Polytron PTMR2100). Тъканият лизат беше центрофугиран за 3 минути на 14 000 rpm и беше отделена супернатанта. Към супернатантата беше добавен 70% етанол и разтворът беше прехвърлен в спин-колонка със силикатно покритие, поставена в събирателна микроцентрифужна епруветка. Колонката беше промита с буфер RW1, а впоследствие и с буфер RPE. Пречистеното РНК, останало по силикатната мембрана в колонката, беше елуирано с 50 µl ултрачиста вода и последващо центрофугиране. Количеството и чистотата на изолираната тотална РНК бяха потвърдени със спектрофотометър (NanoDrop 2000/20000c, Thermo Scientific).

5.5.2. Синтез на cDNA

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

5.5.3. Синтез на темплейт

Специфични праймери (forward и reverse) бяха проектирани с помощта на софтуерната програма Primer3¹²¹. Изградените праймери бяха с големина от 20 нуклеотидни бази и приблизително съдържание на CG от 55% (Таблица 1). Теоретичната дължина на ампликона беше с големина над 600 kb с цел по-доброто захващане на пробата за тъканта. Към изградените праймери бяха добавени секвенции за T7 и SP6 (T7: GCGTAATACGACTCACTATAGGG, Sp6: GCGATTTAGGTGACACTATAG), необходими за последващия синтез на рибопроба. За определяне на оптималната температура за свързване на праймерите към cDNA беше използван температурно-градиентен протокол за PCR с различни температури от 49°C до 62°C. Бяха използвани четири аликвоти на различни температури, всяка от които съдържаеше 10x полимеразен буфер, 2 mM dNTPs (10mM dNTPs, Roche), Taq полимераза (5 U/μl, Qiagen), cDNA 5 μl, 10 pmol от forward и reverse праймерите (100 pmol, MWG Biotech) и вода Milli-Q. Параметрите на PCR машината (Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler Thermal Cycler) бяха следните: 2 минути първоначална денатурация на 94°C, последвани от 35 амплификационни цикъла от 25 секунди денатурация (94°C), 25 секунди свързване (49° до 62°C), 1 минута и 15 секунди удължаване (72°C) и финално удължаване за 9 минути на 72°C. Полученият ампликон беше анализиран на 1% агарозен гел за определяне на оптимална температура на свързване на праймерите към cDNA.

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

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

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

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

5.5.4. Синтез на рибопроби

Рибопробите бяха синтезирани чрез *in vitro* транскрипция. Смес от 1.5 µg от вече синтезирания ДНК темплейт заедно с 2.5 µl 10x РНК транскрипционен буфер (New England Biolabs), 2.5 µl 10x DIG (Digoxigenin) или 2.5µl 10x Fluorescein микс за бележене на РНК (Roche), 1.5 µl Sp6 РНК полимераза (20,000 U/ml, New England Biolabs), 1 µl от РНКаза инхибитор (40 U/µl, Thermo Scientific) и DEPC-третирана вода (Invitrogen) до общ обем от 30 µl беше инкубирана за 3 часа на 37°C. За двойните флуоресцентни *in situ* хибридизационни оцветявания беше използвана една проба, белязана с Digoxigenin (DIG), и една проба, белязана с Fluorescein. Използваните дигоксигенин или флуоресцеин са конюгирани с уридин – гликолизиран пиримидинов аналог, прикрепен за рибоза. Така при *in vitro* транскрипцията всеки уридин ще бъде свързан с дигоксигенин или флуоресцеин. Последва третиране с 1 µl от ДНаза I

(Roche), необходимо за отстраняване на остатъчни следи от ДНК. За извършване на РНК преципитация към получения разтвор бяха прибавяни 108 μ l 4 М амониев ацетат и 705 μ l 100% етанол, предварително изстудени на -20°C . Разтворът беше инкубиран на -80°C за едно денонощие. На следващия ден пробите бяха центрофугирани на 14 000 rpm за 1 час на 4°C . Получената супернатанта беше отстранена, а РНК преципитатът беше промит с 70% етанол, изсушен за 2–3 минути и елуиран в 30 μ l DEPC-третирана вода (Invitrogen). Получената рибопроба беше количествено проверена на спектрофотометър. Към останалото количество рибопроба беше добавен хибридизационен буфер (Ambion) до финална концентрация на пробата от 100 ng/ μ l. Пробите бяха съхранявани на -20°C до използването им за хибридизация на препаратите^{43, 118–120}.

5.5.5. Колориметрично in situ хибридизационно оцветяване

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

За колориметричното ISH оцветяване беше използван следният протокол:

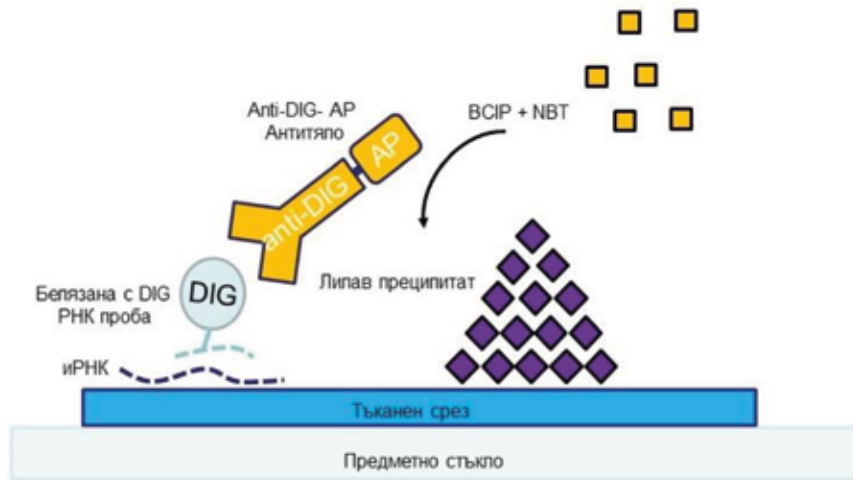
Всички използвани разтвори бяха приготвени с DEPC-третирана вода, а всички стъпки бяха направени на стайна температура, ако по-надолу в текста не е спомената определена температура. Препаратите бяха предварително извадени от фризер на -80°C и оставени да се темперират на стайна температура за 20 минути. Съответните срези бяха рехидратирани за 5 минути с PBS (Phosphate-buffered saline, буфериран фосфатен буфер), денатурирани с 0.2 N HCl за 10 минути за по-добро проникване на пробата и измити отново с разтвор на PBS (Фиг. 7). За денатуриране на свързаните с mRNA протеини срезите бяха инкубирани два последователни пъти с протеиназа К (35–40 μ l/100 ml), разтворена в активиращ Proteinase К (ПК) буфер (1 М Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 М EDTA (pH 8.0) и H₂O). Беше извършено двукратно промиване на препаратите по 5 минути с PBS. Срезите бяха фиксирани с 4% разтвор на PFA в PBS за

15 минути и отново промити 2 пъти по 5 минути в PBS. Беше извършена пре-хибридизация за 30 минути на 60°C с хибридационен (Hyb) буфер, като към него беше добавен непосредствено 1 mg/ml диетилтритол (DTT, Thermo Fisher Scientific). Беше подготвена определената от тестовото оцветяване концентрация на пробата в разтвор, съдържащ tRNA (подпомага свързването на рибопробата към съответната иРНК) и Hyb буфер с обем 100 μ l. Инкубацията продължи едно денонощие на 60°C. На следващия ден препаратите бяха промити с разтвори на натриев цитрат с различна концентрация на 60°C за измиване на несвързаната с иРНК проба. Последва промиване с PBST (Phosphate-buffered saline с добавен 0.1% Tween-20) и блокиране с 10% инактивиран овчи серум, разтворен в PBST. Последната стъпка е необходима за предотвратяване неспецифичното свързване на антигените поради използването в следващата стъпка на анти тяло, произведено в овца, което разпознава дигоксигенин, инкорпориран при *in vitro* транскрипцията на РНК. Анти тялото anti-Digoxigenin-AP (Alkaline Phosphatase) беше разрежено заедно с 10% инактивиран овчи серум в PBST и инкубирано на стайна температура за 1 час и 30 минути. Последва стъпка с измиване в PBST 2 пъти по 20 минути. След това препаратите бяха третираны с TMN буфер с добавен непосредствено към него левамизол, използван като инхибитор на ендогенната алкална фосфатаза (5mM Levamisole; pH 9.5). Оцветяването на препаратите се извърши с разтвор на NBT (nitro-blue tetrazolium chloride, Roche) и BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt, Roche), разтворени в TMN буфер. Препаратите бяха наблюдавани на светлинен микроскоп през 30 минути до появяване на специфичното виолетово оцветяване. Реакцията беше спряна чрез промиването им в PBS 3 пъти по 10 минути. Препаратите бяха покрити със среда Hydro-Mount и оставени да изсъхнат на 37°C за едно денонощие^{43, 118-120}.

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

Не-радиоактивна колориметрична ин-ситу хибридизация

DIG: Дигоксигенин (Хаптен)
AP: Алкална Фосфатаза



Фиг. 7: Схематично представяне на колориметрично in situ хибридизационно оцветяване.

Представено с модификации по „In Situ Hybridization Methods. Vol. 99“
(Springer New York, 2015)¹²⁰.

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

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

Експресията на всеки един от тях беше измерена в епендимния слой (Ependymal layer, EL) и субепендимния слой (Subependymal layer, SEL) по цялата дължина на

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

5.5.7. Ростро-каудална пролиферация в нормален маймунски мозък

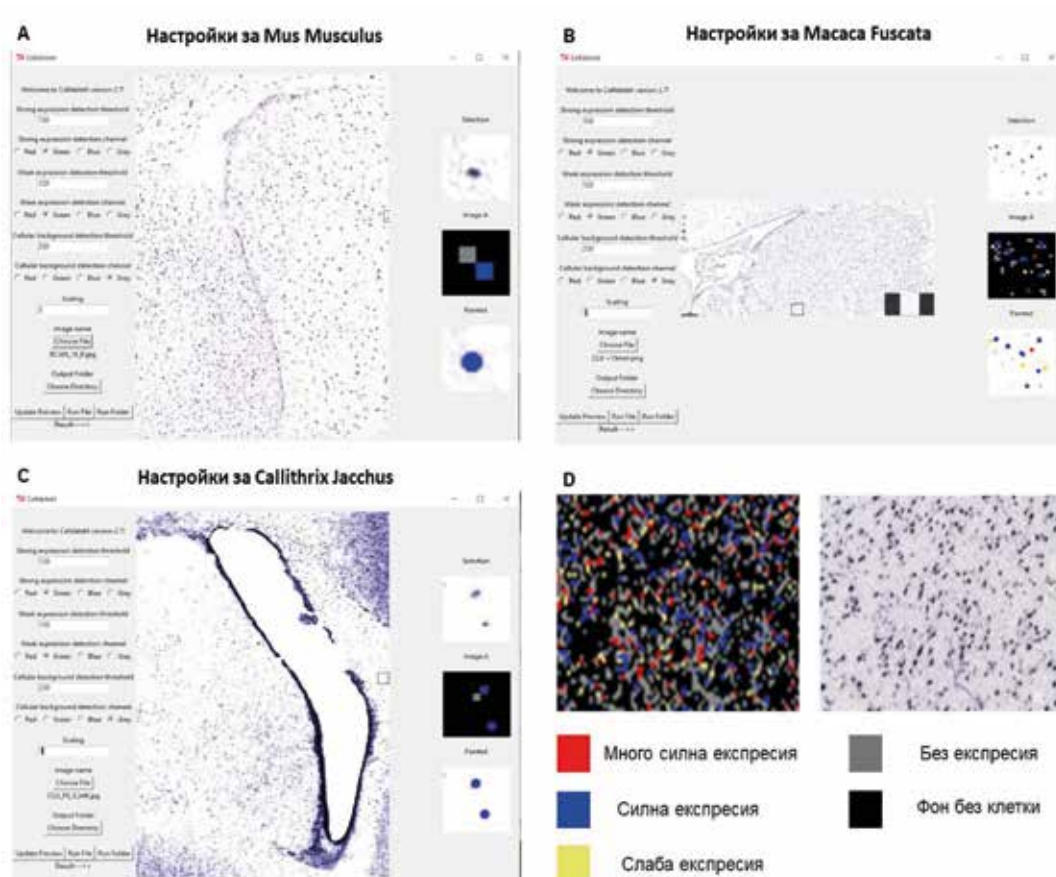
За да разберем количеството на дялящите се клетки по ростро-каудалната ос на вентрикула, използвахме имунохистохимично оцветяване за пролиферативния маркер Ki67. Накратко, препаратите бяха подложени на антигенно възстановяване (DAKO PT Link, Germany) в цитратен буфер (pH 6) на 97°C за 5 минути с последващо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

ображения бяха взети от „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²².

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

За осъществяване на ростро-каудалния анализ бяха използвани отворени бази данни, съдържащи информация за генната експресия на TNC, APLNR, CD38 и GJA1 на три коронарни нива, отговарящи съответно на най-ростралната част на вентрикула (+30)¹²², средата (+23)¹²² и най-каудалната част (+15)¹²² (Фиг. 24) при *Mus musculus*, *Callithrix jacchus* и *Macaca fuscata*. За ориентир бяха използвани различни анатомични маркери (например мястото на отваряне на трети вентрикул). Околичествихме експресията на гените чрез полуавтоматично преброяване на позитивните клетки чрез софтуера CellDetekt по цялата дължина на вентрикула при трите вида. Експресията на всеки един от тях беше измерена в субependимния слой (Subependymal layer, SEL) по цялата дължина на вентрикула и в случайно избран регион в стриатума (200 x 200 μm) посредством софтуера CellDetekt. Бяха използвани различни настройки за обработване при трите вида бозайници (Фиг. 8). Самият софтуер намира локализацията на клетките и определя степента на експресия на дадения ген, като ги категоризира в следните категории. (1.) В червено: клетки с много силна експресия на дадения ген; (2.) В синьо: клетки със силна експресия; (3.) В жълто: клетки със слаба експресия; (4.) В сиво: клетки без експресия; (5.) В черно: фон без клетки.

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



Фиг. 8: Настройки, използвани в CellDetekt за *Mus musculus* (A), *Callithrix jacchus* (C) и *Macaca fuscata* (B). Примерно изображение за резултат, получен след използване на CellDetekt, и цветно категоризиране степента на експресия (D).

5.5.9. Флуоресцентно *in situ* хибридизационно оцветяване

За флуоресцентното ISH оцветяване беше използван следният протокол:

Всички използвани разтвори бяха приготвени от DEPC-третирана вода, а всички стъпки бяха направени на стайна температура, освен когато се споменава по-надолу в текста определена температура. Препаратите бяха предварително извадени от фризер на -80°C и оставени 20 минути да се темперират на стайна температура (Фиг. 9). Ендогенната пероксидаза на съответните срези беше блокирана с 3% H_2O_2 в метанол, приготвен непосредствено преди инкубацията. Срезите бяха промити за 2 пъти по 5 минути с PBS (Phosphate-buffered saline, буфериран фосфатен буфер), денатурирани с 0.2 N HCl за 10 минути за по-добро проникване на пробата и измити отново с разтвор на PBS. За денатуриране на свързаните с mRNA протеини срезите бяха

инкубирани два последователни пъти с протеиназа К (35–40 μ l/100ml), разтворена в активиращ РК буфер (1 М Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 М EDTA (pH 8.0) и H₂O). Беше извършено промиване на препаратите 2 пъти по 5 минути с PBS. Срезите бяха фиксирани с разтвор на 4% PFA в PBS за 15 минути и отново промити 2 пъти по 5 минути в PBS. Беше извършена прехидризация за 30 минути на 60°C с Hyb буфер, като към него беше добавен непосредствено 1 mg/ml диетилтретол (DTT, Thermo Fisher Scientific). Беше подготвена определената от тестовото оцветяване концентрация на пробата, белязана с дигоксигенин (за единично флуоресцентен FISH), в разтвор, съдържащ tRNA (подпомага свързването на рибопробата към съответната иРНК) и Hyb буфер с обем 100 μ l. Инкубацията продължава едно денонощие при 60°C. В случаите на двойни FISH оцветявания една от пробите беше белязана с дигоксигенин, а другата с флуоресцеин в съответните работни концентрации.

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

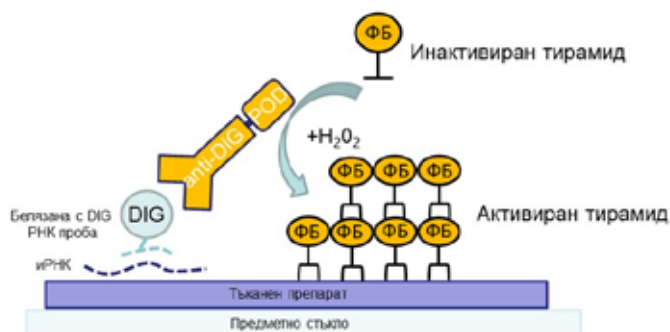
Препаратите бяха измити с TNT (Tris-NaCl-Tween буфер) 3 пъти по 5 минути. Флуоресцентното оцветяване беше направено с тирамиден работен разтвор, съдържащ флуорофлорен тирамиден разтвор (Cy3), разрежен в 1x амплификационен буфер. Инкубацията с последния разтвор продължи 3 минути. Целта на последните стъпки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

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

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

Не-радиоактивна флуоресцентна ин-ситу хибридизация

DIG: Дигоксигененин (Хаптен)
 POD: Пероксидаза
 ФБ: Флуоресцентна боя



Фиг. 9: Схематично представяне на флуоресцентно in situ хибридизационно оцветяване (Fluorescent In situ hybridization, FISH).

Представено с модификации по „In Situ Hybridization Methods. Vol. 99“
 (Springer New York, 2015)¹²⁰.

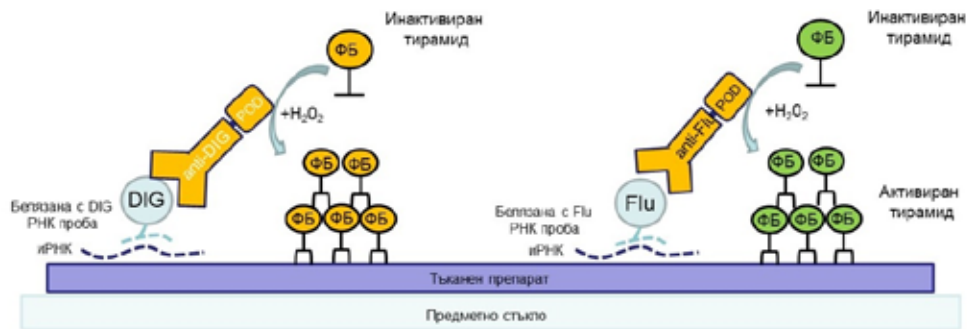
Не-радиоактивна флуоресцентна ин-ситу хибридизация Единично и двойно оцветяване

DIG: Дигоксигененин (Хаптен)

Flu: Флуоресцеин

POD: Пероксидаза

ФБ: Флуоресцентна боя



Фиг. 10: Схематично представяне на двойно флуоресцентно in situ хибридизационно (FISH) оцветяване.

На схемата не е представено блокирането на анти-дигоксигенин антитяло с HCl.

Представено с модификации по „In Situ Hybridization Methods. Vol. 99“

(Springer New York, 2015)¹²⁰.

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

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

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

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

Таблица 3: Списък на вторични антители, техния тип и приложение за целите на настоящото проучване. Използвани съкращения: Rb, rabbit; Mo, mouse; Gt, goat; Gpig, guinea pig; Chk, chicken

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

5.6. BrdU протокол

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

5.7. Фенотипен анализ на APLNR в нормален човешки мозък

За целите на фенотипизацията на APLNR+ клетки в нормален мозък (без следи от патологични или невро-психиатрични промени) бяха използвани три човешки мозъка, дисецирани от едни и същи изследователи, като са прилагани винаги едни и същи анатомични обекти за ориентация. Всички дисецирани мозъци бяха взети от рутинни аутопсии с post-mortem период <24h. Дисецираните тъкани съдържаха предната част на латералния вентрикул заедно с подлежащата част на n. caudatus. След направената дисекция тъканите бяха промити за кратко в PBS, а след това фиксирани в пресен 4% разтвор на PFA за 24h на 4°C. Последва 24h измиване с чешмяна вода и последващо криопротектиране с нарастваща концентрация сукроза (10, 15, 30% разтвор). Впоследствие бяха поставени на -80°C в O.C.T. (Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) Compound, Sakura, USA) за едно денонощие. Замразените препарати бяха нарязани на криостатен микротом (Leica CM3050S) на тъканни срези с дебелина 25 µm. Препаратите бяха оставени да изсъхнат на 37°C за едно денонощие. На следващия ден препаратите бяха подложени на антигенно възстановяване (DAKO PT Link, Germany) в цитратен буфер (pH 6) на 97°C за 5 минути с последващо охлаждане на лед за 30 минути. Препаратите бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и блокирани за 1 час с 10% (Cat. No S-1000, Vectorlabs) нормален кози серум, разтворен в PBS с 0.1% Tween-20. Първичните антитела (Таблица 2) бяха инкубирани в комбинация с блокиращ разтвор за едно денонощие на 4°C. На следващия ден стъклата

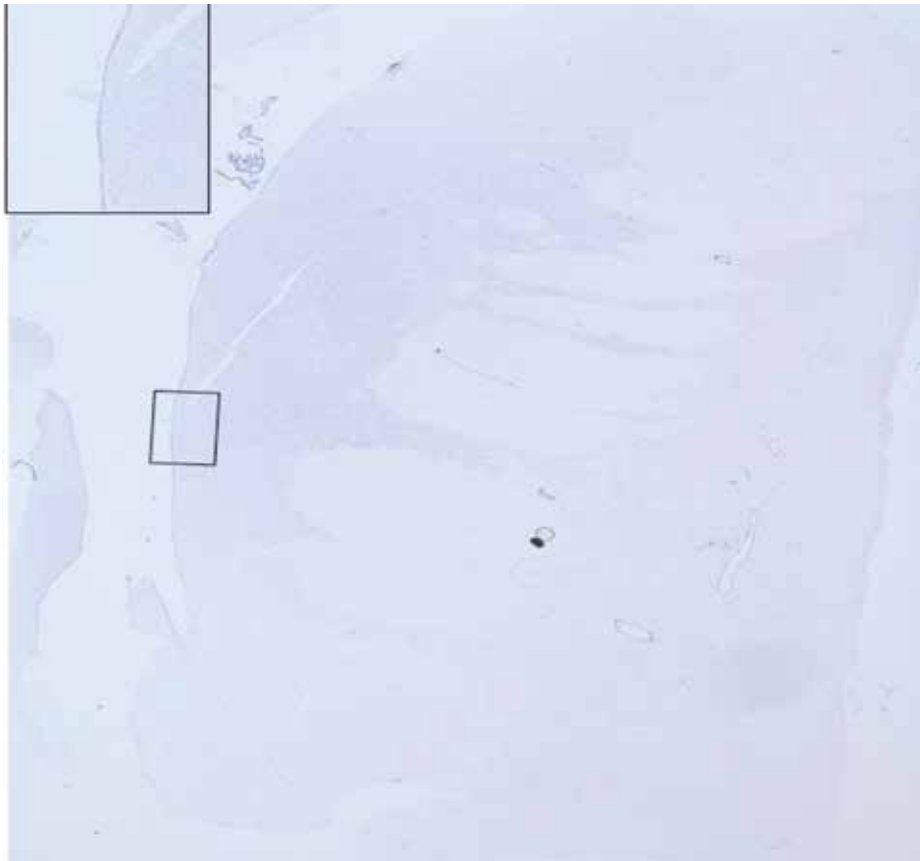
бяха промити в PBS 3 пъти по 5 минути и инкубирани за 2 часа на стайна температура с вторични антитела (Таблица 3), конюгирани с AlexaFluor-488, 555 или 647 (Thermo Fisher Scientific, Germany). След това стъклата бяха промити с PBS 3 пъти по 5 минути и бяха покрити с покривна среда (ProLong Gold Antifade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

5.8. Контролни оцветявания и изследвания

1. Специфичността на ISH и имунохистохимичните оцветявания беше проверена чрез негативни и позитивни контролни оцветявания.
2. При осъществяване на полимеразно-верижната реакция (PCR) използвахме позитивна контрола за CALB1 с изключване на Taq полимеразата. При тези амплификации не бяха наблюдавани ДНК бандове при анализа на резултатите от гел електрофорезата.

Негативни контролни оцветявания:

1. ISH, FISH: Негативните контроли за ISH и FISH бяха оцветени с всички стъпки с изключение на инкубацията със самата РНК рибопроба. При всички препарати, третирани в отсъствието на РНК рибопроба, не се наблюдаваше оцветяване (Фиг. 11).

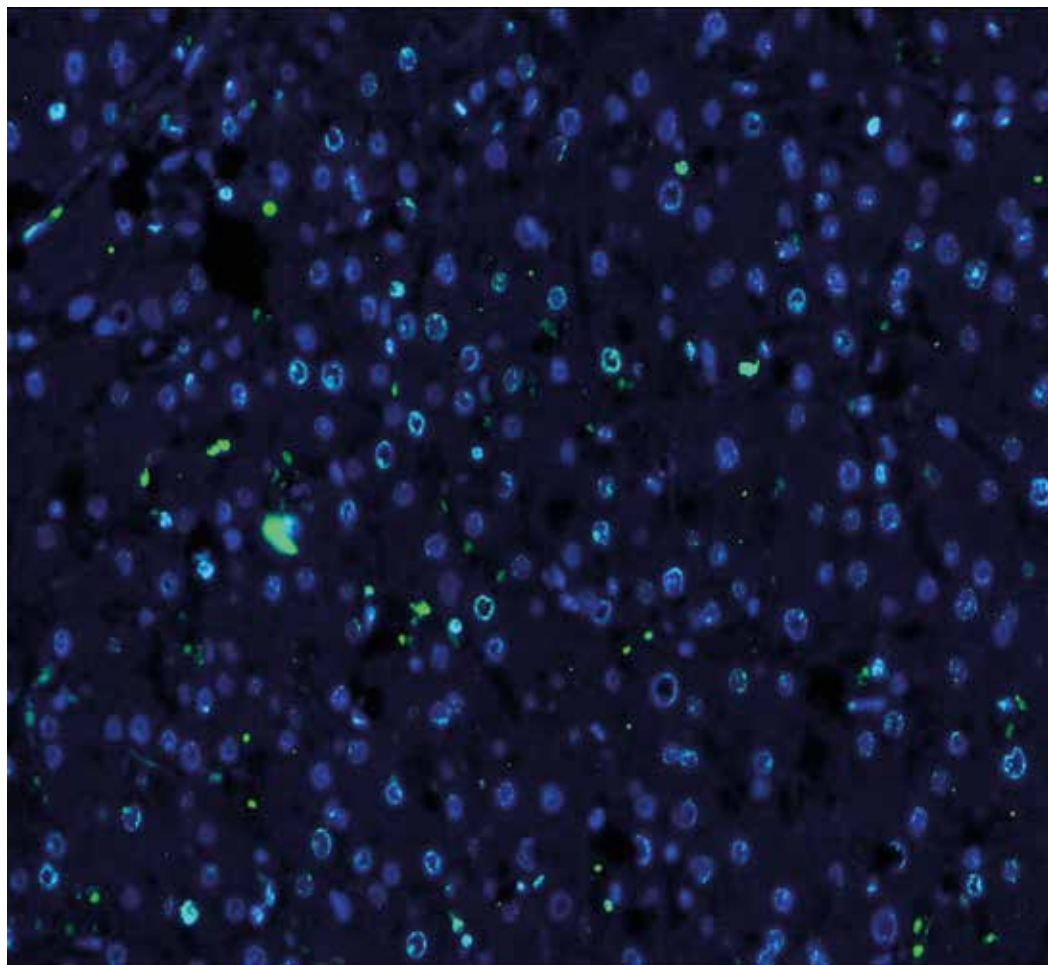


Фиг. 11: Препарат, инкубиран в отсъствие от рибопроба, не показва оцветяване (негативна контрола)

2. Антитела: При оцветяването с антитела срезите бяха оцветени с осъществяване на всички стъпки с изключение на инкубацията с първични антитела. Всички препарати, третирани в отсъствие на първични антитела, останаха имунонегативни.
3. BrdU: За да изключим фалшиво позитивно оцветяване за BrdU, заедно с тъканите от маймуните, инжектирани с BrdU, бяха направени и паралелни оцветявания от тъкани на маймуни, които не са третирани с BrdU. В допълнение направихме и негативни контроли, при които не инкубирахме антитяло срещу BrdU. И при двата описани случая не наблюдавахме оцветяване за BrdU.
4. PCR: При осъществяване на полимеразно-верижната реакция използвахме негативна контрола, включваща всичко останало с изключение на Taq полимеразата. При тези амплификации не бяха наблюдавани ДНК бандове при анализа на резултатите от гел електрофорезата.

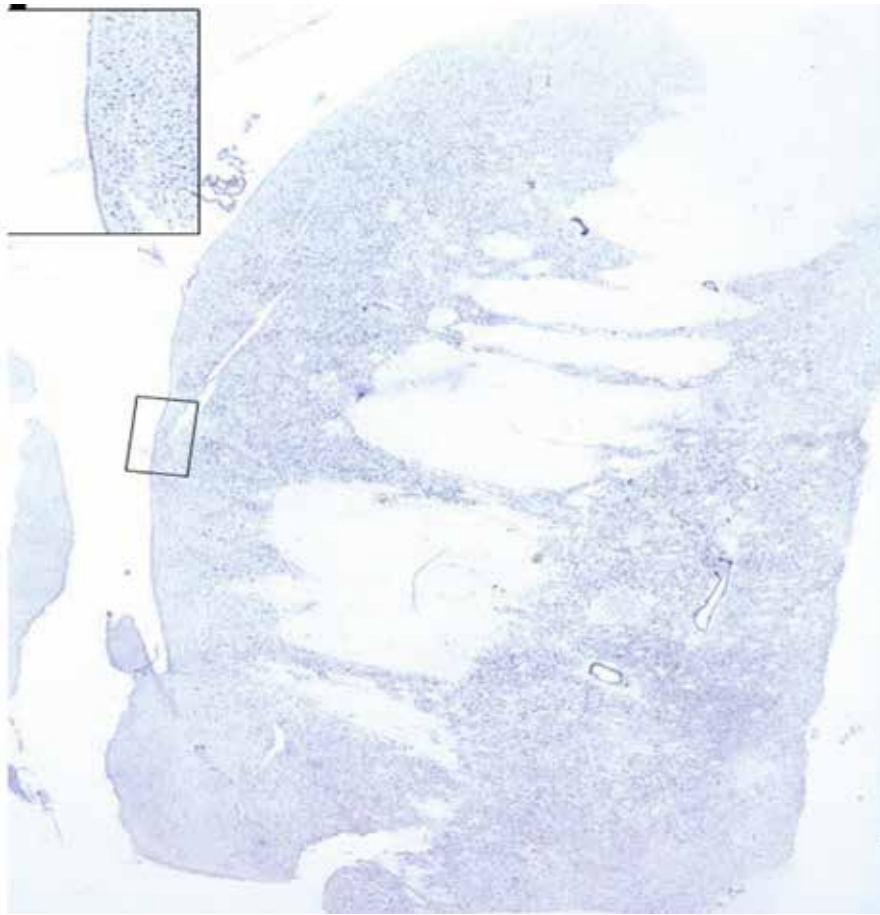
Позитивни контроли:

1. За потвърждаване на специфичното оцветяване на BrdU бяха използвани тъкани с наличие на пролифериращи клетки (чревен епител), взети от маймуни, третирани с BrdU. Последните показаха ясно ядрено оцветяване.
2. За тестване специфичността на използваните антитела направихме имунохистохимични оцветявания на срези, взети от органи, където има данни за експресията на дадения протеин (например APLNR – черен дроб; Фиг. 12)



Фиг. 12: Препарат, инкубиран с антитяло за APLNR, показва специфично оцветяване за протеина в чернодробна тъкан

3. Като контролно позитивно оцветяване за ISH и FISH беше използвана пробата CALB1 (Calbindin 1) в концентрация 100 ng/ml поради обилната му експресия в ЦНС. (Фиг. 13)



Фиг. 13: Препарат, инкубиран с рибопроба за CALB1, показва специфично оцветяване за този ген и беше използван като позитивна контрола

5.9. Заснемане на препаратите

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

1. Висококачествена обзорна снимка (снимана на мозайка) на перивентрикулярната тъкан, заснета с обектив EC Plan-Neofluar 20x/0.50 с латерална резолюция от 0.65 $\mu\text{m}/\text{px}$.
2. От 3 до 5 снимки на полета от SVZ на предметно стъкло с функцията z-stack, заснети с обектив EC Plan-Neofluar 40x/0.75 с латерална резолюция от 0.325 $\mu\text{m}/\text{px}$ и аксиална резолюция (z-разстояние) между 0.125 и

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

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

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

5.10. Обработка на изображенията

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

Обработката и анализът на изображенията бяха извършени в софтуера FIJI/ImageJ^{126, 127} и отчасти в CellProfiler^{128, 129} enabling chemical screens and functional genomics (for example, using RNA interference. Всички изображения бяха обработени по един и същ алгоритъм.

1. 2-D проекция на z-stack

Срезите с дебелина 20 μm съдържат пространствена 3-D информация. Ние решихме да заснемен Z-stack от зоните на интерес и да направим 2-D проекция на фокусираните пиксели. За тази цел използвахме алгоритъм за Smooth manifold extraction^{130, 131}

с плъгин SME projection на FIJI/ImageJ (<https://github.com/biocompibens/SME/>). Алгоритъмът ефективно екстрахира само фокусираните участъци от z-стака и премахва светлината извън фокус, която може да затрудни сегментирането и обработката на образите.

2. Премахване на шума (от англ. Denoising)

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

3. Филтриране тип Top-Hat

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

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

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

- а. Вместо да използваме „класическо“ отваряне и затваряне (както беше описано по-горе), ние извършихме отваряне чрез реконструкция. По този начин ерозията на изображението се реконструира чрез геодезическа дилатация, докато се „побере“ в оригиналното изображение (вместо да се използва структурният елемент)¹³⁴.
- б. Преди „отваряне чрез реконструкция“ фоните „дупки“, които могат да създадат фалшиви пикове след изваждането, бяха премахнати чрез „затваряне чрез реконструкция“ – дилатация, последвана от геодезическа ерозия.

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

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

1. Морфологична дилатация на оригиналното изображение с дискоиден структуриращ елемент с радиус r .
2. Морфологична реконструкция чрез „ерозия“ на разширеното изображение от оригиналното изображение (начало = разширено изображение, маска = оригинално изображение, свързаност = 8).
3. Морфологична ерозия на затвореното изображение с дискоиден структуриращ елемент с радиус r .
4. Морфологична реконструкция чрез разширяване на „ерозираното“ изображение от „затвореното“ изображение (начало = разширено изображение,

маска = затворено изображение, свързаност = 8), което е приближение на фона без обектите, по-малки от r .

5. Аритметично изваждане на фона от оригиналното изображение.

4. Z-нормализиране на яркостта на изображението

Филтрираните изображения бяха преобразувани в 32-битов формат и яркостта на пиксела беше мащабирана до Z-стойности (z-score):

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

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

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

5. Генериране на региони на интерес (RoIs)

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

6. Прагова обработка тип „Z-score“

По-голямата част от всяко флуоресцентно изображение е заета от фон. Факт, който може да се интерпретира, че сигналът заема положителни отдалечени пиксели (със стойност на сивото, по-голяма от няколко стандартни отклонения в положителна посока от средната стойност на изображението). Значителна част от всеки останал фон от измервателните (т.е. не-DAPI) канали беше изключен от анализа чрез задаване на 0 за всички пиксели с Z-резултат, по-малък от 1 (по-вероятно е да принадлежат към фона).

5.11. Анализ на изображенията

1. Класификация на RoI

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

5.12. Обработка на данните и статистика

За избора на подходящи прагове на припокриване за алгоритъма за класификация ние извършихме анализ на ROC кривата¹³⁵ на няколко мерки (средна сива стойност, необработена интегрирана плътност, част от площта от сигнала след автоматичния прагов алгоритъм по Li (който автоматично изчислява глобален праг за разделяне на сигнал от фон) от ~300 произволно избрани RoIs в SEL, които са оценени от опитен изследовател като положителни или отрицателни за всеки маркер, записан в съответните изображения. ROC кривите показаха добро съответствие между трите мерки и

класификацията от експерта и фракцията на надпраговата площ по Ли беше избрана като най-лесна за прилагане в скрипта за автоматизация на броенето. Изображенията бяха разделени на три групи в зависимост от основния тип на открития маркер и очакваните прилики в тяхното локално пространствено разпределение – FISH, ядрени маркери и извънядрени ИНС маркери. Праговете бяха изчислени за всяка група поотделно: за FISH изображения и извънядрени ИНС изображения бяха избрани прагове (вижте в анализа на изображения), които максимизират сумата от чувствителност (дял на истински позитивните резултати) и специфичност (дял на истински негативните резултати), докато за ядрените маркери поради малкия относителен брой на положителни клетки предпочетохме да максимизираме специфичността.

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

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

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

6. РЕЗУЛТАТИ

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

За да разберем по-добре характеристиката на експресия на различни гени с повишена експресия в предната субвентрикуларна зона в норма и след исхемично увреждане, използвахме публичната свободна дигитална база данни monkey-niche.org. Тази информационна система включва 150 гена, функционално свързани със стволово-клетъчната биология⁴³. Всички гени бяха визуално инспектирани за нива на експресия в четири зони на интерес и бяха аотирани спрямо нивото им на експресия (Фиг. 13) (виж материали и методи – 5.1. Селектиране на гени за фенотипен анализ).

Ген	Контрол				Ген	Исхемия			
	IL	SEL	STN	PVBL		IL	SEL	STN	PVBL
APLNK	*	*	*	*	APLNK	***	***	***	*
ATP7	*	*	*	*	ATP7	***	***	***	*
CNTN1	***	**	***	*	CNTN1	***	***	***	*
CLU	*	**	**	*	CLU	***	***	***	*
CXKC5	*	*	*	*	CXKC5	***	***	***	*
FAM107A	**	*	*	*	FAM107A	***	***	***	*
FTO	**	**	***	*	FTO	***	***	***	*
GJA1	*	**	**	*	GJA1	***	***	***	*
GPMB9	*	*	**	*	GPMB9	***	***	***	*
LRG1	*	*	*	*	LRG1	***	***	***	*
NACC2	**	*	***	*	NACC2	***	***	***	*
NDST1	**	*	**	*	NDST1	***	***	***	*
NEUROG2	**	**	*	*	NEUROG2	***	***	***	*
MAX	*	*	**	*	MAX	***	***	***	*
PHKG1	**	*	*	*	PHKG1	***	***	***	*
SCD5	*	*	**	*	SCD5	***	***	***	*
TNC	*	*	***	*	TNC	***	***	***	*
TNR	*	*	**	*	TNR	***	***	***	*
TXNP	**	***	***	*	TXNP	***	***	***	*
VIMENTIN	*	*	*	*	VIMENTIN	***	***	***	*
ZBTB20	**	*	***	*	ZBTB20	***	***	***	*
ANGPT1	*	*	*	*	ANGPT1	**	**	**	*
ASCL1	*	*	*	*	ASCL1	**	**	**	*
EFNB1	*	*	*	*	EFNB1	**	**	**	*
FITM2	*	*	**	*	FITM2	**	**	**	*
PPAP2B	*	*	*	*	PPAP2B	**	**	**	*
SERPIN6	*	*	*	*	SERPIN6	**	**	**	*
THRA	**	*	**	*	THRA	**	**	**	*
TMEM7A	*	*	*	*	TMEM7A	**	**	**	*
ZEB1	*	*	*	*	ZEB1	**	**	**	*
ADRA1A	*	*	**	*	ADRA1A	***	***	***	*
GPRC9B	***	***	***	*	GPRC9B	***	***	***	*
LRG3	**	*	***	*	LRG3	***	***	***	*
LRRCA4	*	*	**	*	LRRCA4	***	***	***	*
MAML2	**	*	*	*	MAML2	***	***	***	*
NRBP2	*	*	***	*	NRBP2	***	***	***	*
CORO1B	*	*	***	*	CORO1B	***	***	***	*
NES	*	*	*	*	NES	***	***	***	*
BBX	*	*	*	*	BBX	**	**	**	*
CLX1	*	*	**	*	CLX1	**	**	**	*
FOXP2	*	*	**	*	FOXP2	**	**	**	*
KCAM1	*	*	*	*	KCAM1	**	**	**	*
PFKFB2	*	*	*	*	PFKFB2	**	**	**	*
PROX1	*	*	*	*	PROX1	**	**	**	*
SEPT9	**	*	**	*	SEPT9	**	**	**	*
VEGFA	*	*	**	*	VEGFA	**	**	**	*
POLR2A	*	*	*	*	POLR2A	**	**	**	*
PPL	*	*	*	*	PPL	**	**	**	*
ZBTB16	*	*	*	*	ZBTB16	***	***	***	*
VCAM1	*	*	*	*	VCAM1	***	***	***	*
MLC1	*	*	*	*	MLC1	***	***	***	*
WLS	*	*	*	*	WLS	***	***	***	*
CPNE2	*	*	*	*	CPNE2	**	**	**	*
DLX2	*	*	*	*	DLX2	**	**	**	*
IFNGR1	***	**	***	*	IFNGR1	***	**	***	*
MVB12B	**	*	**	*	MVB12B	***	**	***	*
G2	**	*	**	*	G2	**	*	**	*
CHN2	*	*	*	*	CHN2	**	*	**	*
OPSM1	**	*	**	*	OPSM1	**	*	**	*
ITGB8	*	*	*	*	ITGB8	**	*	**	*
NCAM1	*	*	**	*	NCAM1	**	*	**	*
GFAP	*	**	*	*	GFAP	**	**	**	*
ELAVL3	*	*	**	*	ELAVL3	***	**	***	*
FLCN	*	*	**	*	FLCN	***	**	***	*
ONAO1	*	*	**	*	ONAO1	***	**	***	*
LGR5	**	*	***	*	LGR5	***	**	***	*
NOTCH1	*	**	**	*	NOTCH1	***	**	***	*
PPM1K	*	*	**	*	PPM1K	***	**	***	*
PITPLB	*	*	**	*	PITPLB	***	**	***	*
GPR17L1	*	*	*	*	GPR17L1	***	**	***	*
NEO1	*	*	**	*	NEO1	***	**	***	*
FEZ1	*	*	**	*	FEZ1	***	*	***	*
CRYBB2	*	*	**	*	CRYBB2	**	*	**	*

Фиг. 14 (начало): Визуално оценяване на гените, публикувани в monkey-niche.org

ELAVL4	*	*	*	-	ELAVL4	++	*	++	-
ETV3	*	*	*	-	ETV3	++	*	++	-
EGALNAC3	*	-	++	-	EGALNAC3	++	*	++	*
GLI1	*	-	*	-	GLI1	++	*	++	-
JAKMP3	*	*	++	-	JAKMP3	++	*	++	-
PCYT1B	*	-	*	-	PCYT1B	++	*	++	-
RBM34	*	-	*	-	RBM34	++	*	++	-
SLITRK1	*	-	*	-	SLITRK1	++	*	++	-
SP9	++	*	++	-	SP9	++	*	++	-
BMPT1A	*	*	*	-	BMPT1A	++	*	++	-
LRG2	*	-	++	-	LRG2	++	*	++	-
DOCK1	*	-	*	-	DOCK1	+++	+++	+++	*
FLMC	++	++	*	*	FLMC	+++	+++	+++	*
NLGN3	*	-	*	-	NLGN3	++	++	++	*
ZSCAN12	*	*	*	-	ZSCAN12	++	++	++	*
LX1	*	-	*	-	LX1	++	++	++	*
ULK2	*	-	*	-	ULK2	++	++	++	*
BCAN	*	-	*	-	BCAN	++	+++	+++	*
CD38	-	-	*	-	CD38	*	+++	+++	*
SPARC	-	*	*	*	SPARC	*	+++	+++	*
DCX	-	*	++	-	DCX	-	++	++	-
ZFP64	*	-	++	-	ZFP64	*	*	++	-
EMO2	*	-	++	-	EMO2	*	*	++	-
ABTB2	*	-	*	-	ABTB2	+++	++	++	*
DDR1	*	-	++	*	DDR1	+++	++	++	*
KCNJ10	++	*	*	*	KCNJ10	+++	++	++	*
NAV1	++	*	*	-	NAV1	+++	++	++	*
ODF2	++	*	*	-	ODF2	+++	++	++	*
PHACTR4	*	-	*	-	PHACTR4	+++	++	++	*
RBPJ	*	-	*	-	RBPJ	+++	++	++	*
SP8	+++	++	++	*	SP8	+++	++	++	*
TCP11L2	*	*	*	-	TCP11L2	+++	++	++	*
DIP2A	*	-	*	-	DIP2A	+++	++	++	*
GALC	+++	*	++	-	GALC	+++	++	++	*
PANK	++	*	++	*	PANK	+++	++	++	*
NEK4	++	*	*	-	NEK4	+++	++	++	*
ERBB2	*	-	*	-	ERBB2	+++	*	++	*
KIF2A	*	-	*	-	KIF2A	+++	*	++	*
ACOT6	*	-	*	-	ACOT6	++	*	++	*
MET	*	-	*	-	MET	++	*	++	*
OLIG2	++	*	*	-	OLIG2	++	*	++	*
ZNF704	*	-	*	-	ZNF704	++	*	++	*
ALPL	*	-	*	-	ALPL	++	*	++	*
LRRRC8	*	-	*	-	LRRRC8	++	*	++	*
PROM1	*	-	*	-	PROM1	++	*	++	*
PMP2	*	-	*	-	PMP2	++	*	++	*
SPAT16	*	-	*	-	SPAT16	++	*	++	*
ADN1	++	*	++	-	ADN1	++	++	+++	*
GPR17	-	*	*	-	GPR17	++	++	+++	*
POU3F3	+++	++	+++	*	POU3F3	++	++	+++	*
ELMO1	++	++	++	-	ELMO1	++	++	+++	*
LFNG	*	-	*	-	LFNG	++	*	+++	*
OTOF	++	*	+++	-	OTOF	++	*	+++	*
NCAN	*	-	++	-	NCAN	*	++	+++	*
NFASC	*	-	++	-	NFASC	*	++	+++	*
CALB2	*	-	++	-	CALB2	++	++	+++	*
ABCD3	-	-	*	-	ABCD3	*	*	+++	*
MAP2E2	*	-	++	-	MAP2E2	++	*	+++	*
NR2E1	*	-	+++	-	NR2E1	*	*	+++	*
PER3	++	*	++	-	PER3	*	*	++	-
IGFBP5	-	-	++	-	IGFBP5	*	*	++	*
GSTC0	-	-	*	-	GSTC0	*	*	*	-
IL6ST	*	-	*	-	IL6ST	*	*	*	-
CD83	-	-	*	-	CD83	*	*	*	-
DEC2	*	-	*	-	DEC2	*	*	*	-
ERBB4	++	*	++	-	ERBB4	++	*	++	-
HMMT	*	-	*	-	HMMT	*	*	*	-
LDLRAD3	*	-	*	-	LDLRAD3	*	*	*	-
RAFP3	-	-	*	-	RAFP3	*	*	*	-
CDH13	++	*	*	-	CDH13	++	*	*	-
GREB1	-	-	*	-	GREB1	-	-	*	-
HGF	-	-	*	-	HGF	-	-	*	-
WNT16	-	-	*	-	WNT16	-	-	*	-
SOX2	*	-	*	-	SOX2	*	*	*	-
ZBTB25	*	-	*	-	ZBTB25	*	*	*	-
MCM6	-	-	*	-	MCM6	-	-	*	-

Фиг. 14 (продължение): Визуално оценяване на гените, публикувани в monkey-niche.org

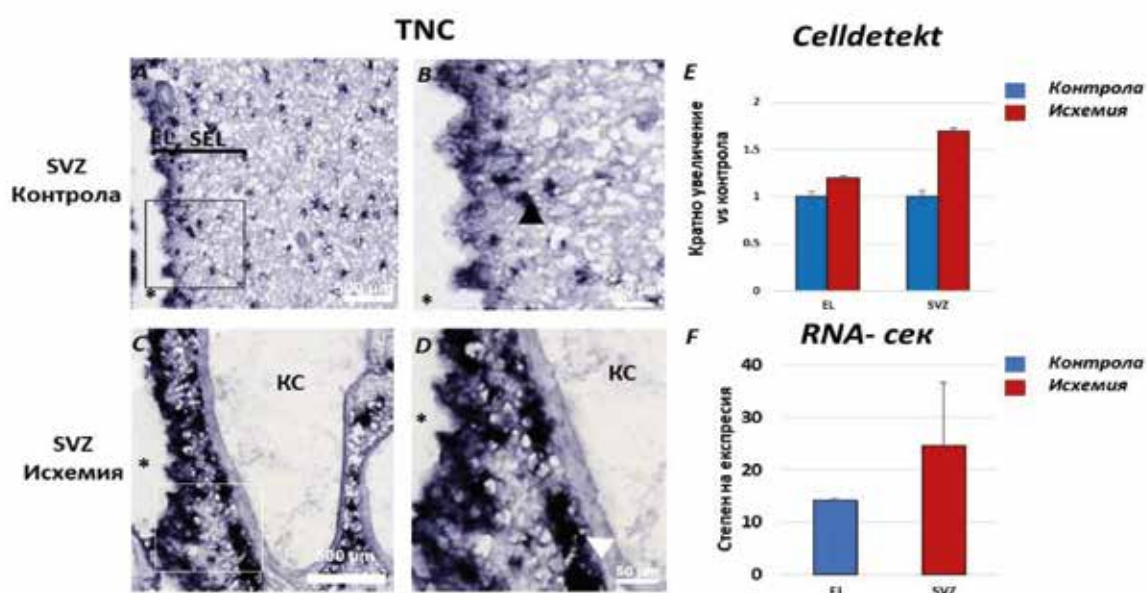
Оценяването беше извършено в четири региона при контроли и след исхемично увреждане – EL, SEL, STR, PVSVZ. Силна експресия с червено и „+++“, средна експресия с оранжево и „++“, ниска с жълто и „+“, а липса на експресия със сиво и „-“.

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

При визуалното оценяване на образите от Monkey-Niche, демонстриращи експресията на TNC, наблюдавахме следното: при контролната маймуна се наблюдават единични клетки с умерена експресия на mRNA в SVZ (+) (Фиг. 14). Наблюдава се също умерена до силна експресия в EL (+). За разлика от здравата контрола, при исхемичното животно клетките са групирани в клъстери със силна експресия (+++). В

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

Количественото определяне със CellDetekt показва, че експресиращите TNC клетки в EL нарастват средно 1.2 пъти (EL – кратно увеличение – 1.2, 95% интервал на доверителност 46.52 – 59.02%) след глобална исхемия в сравнение с контролните животни (EL – 1, 95% интервал на доверителност 20.20 – 32.08%), докато експресиращите TNC клетки в SVZ нарастват средно 1.7 пъти (SVZ – 1.7, 95% интервал на доверителност 29.18 – 34.58%) спрямо контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 15.78 – 20.98%). Същите резултати бяха наблюдавани и при сравнение на транскриптомните данни (Фиг. 15). Нито при контролните, нито при исхемичните оцветявания се установяват данни за дорзо-вентрален градиент на експресия.



Фиг. 15: (А–В) Оцветяване за иРНК на TNC в норма:

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

показващо множество клетки в непосредствена близост до кръвоносния съд (бяла стрелка) и директно под епендимния слой. (E). Данни от измерване със CellDetekt.

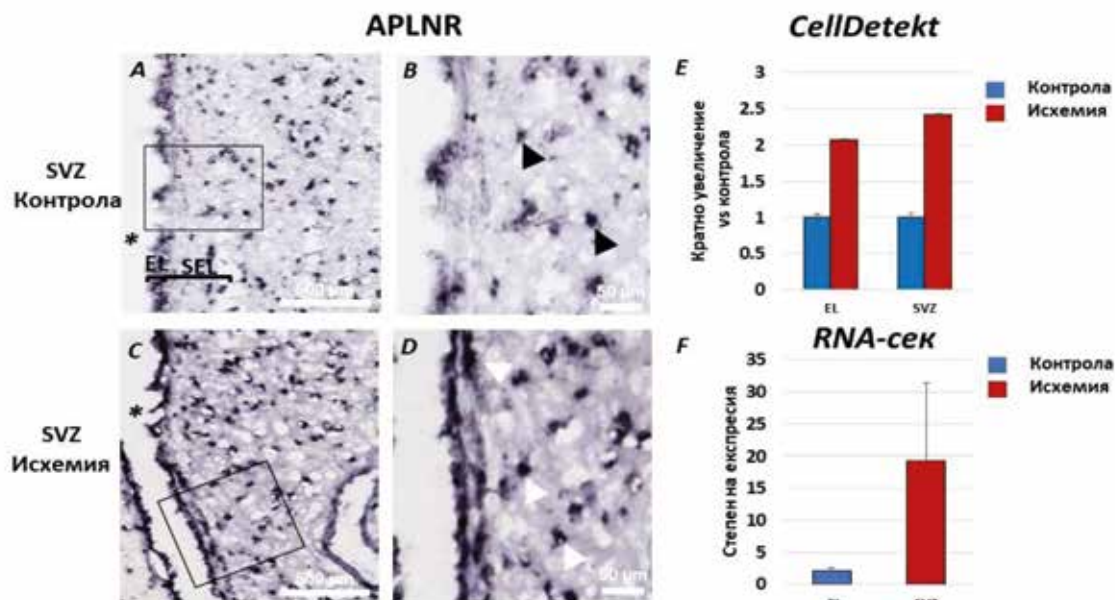
Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия.

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

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

На препаратите, качени в monkey-niche.org и оцветени за mRNA на APLNR, наблюдавахме единични клетки със слаба експресия в SVZ (+) (Фиг. 14). Открива се също слаба експресия в EL (+). При исхемия клетките са групирани в клъстери непосредствено под EL и са със силна експресия (+++). Експресията в епендимния слой е многократно по-засилена в сравнение с контролните оцветявания. При контролните оцветявания не се наблюдава оцветяване периваскуларно (-), което обаче е налице при исхемичните животни (+).

Количествената оценка със CellDetekt показва, че експресиращите APLNR клетки в EL нарастват средно 2 пъти (EL –кратно увеличение – 2.065, 95% интервал на доверителност 46.75 – 59.95%) след глобална исхемия в сравнение с контролните животни (EL – 1, 95% интервал на доверителност 20.29 – 31.21%), докато тези в SVZ нарастват средно 2.4 пъти (SVZ – 2.411, 95% интервал на доверителност 10.36 – 15.36%) спрямо контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 3.52 – 7.05%) (Фиг. 15E). Транскриптомните данни показват ~18-кратно нарастване на транскриптите в сравнение с контролата (Фиг. 15F). Нито при контролните, нито при исхемичните оцветявания имаше данни за дорзо-вентрален градиент на експресия.



Фиг. 16: (A–B) Оцветяване за иРНК на APLNR в норма:

(A). На (A) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SVZ. Нашите наблюдения показват слаба ISH експресия както в EL, така и в SVZ. (B). Увеличение на маркираната зона от A. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и ниска експресия по цялата дължина на епендимата. (C–D). Оцветяване за иРНК на APLNR при исхемия: (C). На (C) се наблюдава SVZ, съдържаща EL, SEL при исхемия. Забелязва се много силна експресия както в EL, така и в SVZ с наличие на групички от клетки (бяла стрелка в D). (D). Увеличение на C, показващо множество клетки в непосредствена близост и директно под епендимния слой. (E). Данни от измерване със CellDetekt.

Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия.

(F). Данни от транскриптомния анализ⁴³. Релативна експресия на APLNR, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия.

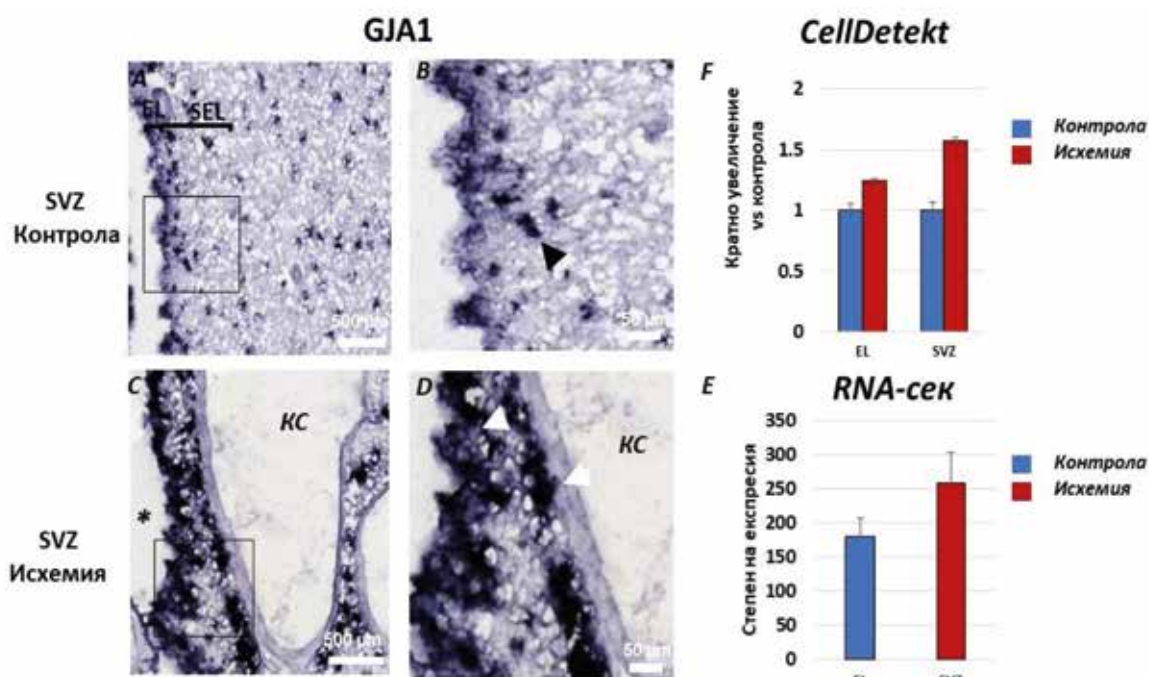
C * е отбелязан латералният вентрикул.

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

При препаратите, оцветени за mRNA на GJA1, наблюдавахме единични клетки със слаба до умерена експресия в SVZ (++) . Наблюдава се също слаба експресия в EL (+). При исхемичните животни непосредствено под EL се оформят отново кълъстери от клетки със силна експресия (+++). Забелязва се и увеличена експресия около кръвоносни съдове (PVSEL +), като в самата съдова стена оцветяване не е налично. SVZ

също демонстрира засилено оцветяване за mRNA на GJA1 в сравнение с контролите (+++).

Количественото определяне със CellDetekt и транскриптомните данни потвърждават увеличението на генната експресия на GJA1 след исхемия (Фиг. 17 Е и F). От направените измервания установихме, че GJA1⁺ клетки в EL се повишават 1.2 пъти след исхемия (EL – кратно увеличение – 1.240, 95% интервал на доверителност 42.24 – 55.35%) спрямо животните без исхемия (EL – 1, 95% интервал на доверителност 33.28 – 45.40%). В SVZ се наблюдава кратно нарастване от 1.5 пъти (SVZ – 1.576, 95% интервал на доверителност 19.24 – 24.58%) спрямо същия регион при контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 11.48 – 16.24%). И при двете оцветявания не се наблюдава дорзо-вентрален градиент.



Фиг. 17: (А–В) Оцветяване за иРНК на GJA1 в норма:

(А). На (А) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SEL при контролно животно. Наблюдава се умерена ISH експресия както в EL, така и в aSVZ. (В). Увеличение на обозначената зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и умерено наличие на mRNA по цялата дължина на епендимата. (С–D). Оцветяване на иРНК на GJA1 при исхемия: (С). На (С) се наблюдава SVZ, съдържаща EL, SEL и кръвоносен съд (КС), при исхемия. Наблюдава се много силна експресия както

в EL, така и в SVZ с масивни струпвания от клетки (бяла стрелка в D.) около КС.

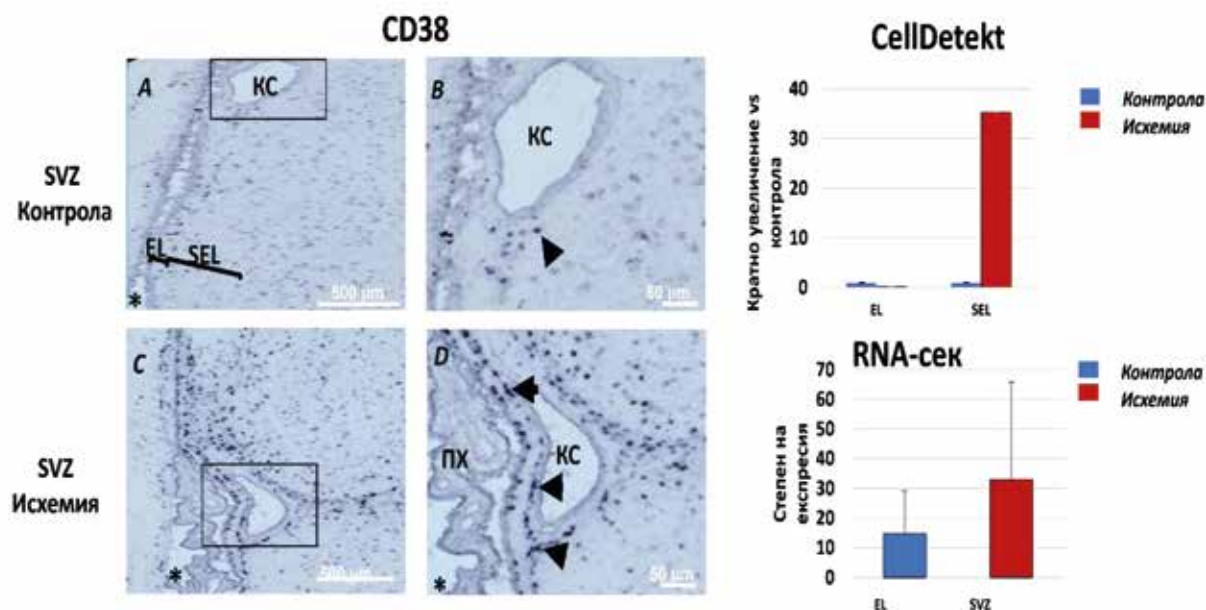
(D). Увеличение на C, показващо множество клетки в непосредствена близост до кръвоносния съд (бяла стрелка) и директно под епендимния слой. **(E).** Данни от измерване със CellDetekt. Кратно увеличение на експресията на иРНК в EL и SVZ след исхемия. **(F).** Данни от транскриптомния анализ (RNA-seq)⁴³. Релативна експресия на GJA1, изразена като брой генни копия при контрола и при исхемия.

C * е отбелязан латералният вентрикул.

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

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

Количественото определяне със CellDetekt и транскриптомните данни потвърждават увеличението на генната експресия на CD38 след исхемия (Фиг. 18 E и F). От направените измервания установихме, че CD38⁺ клетки в EL не се наблюдава повишение след исхемия спрямо животните без исхемия. В SVZ се наблюдавакратно нарастване от 30 пъти (SVZ – 30, 95% интервал на доверителност 28.09 – 33.45%) спрямо същия регион при контролните животни (SVZ – 1, 95% интервал на доверителност 13.33 – 15.33%). И при двете оцветявания не се наблюдава дорзо-вентрален градиент.



Фиг. 18: (А–В) Оцветяване за иРНК на CD38 в норма:

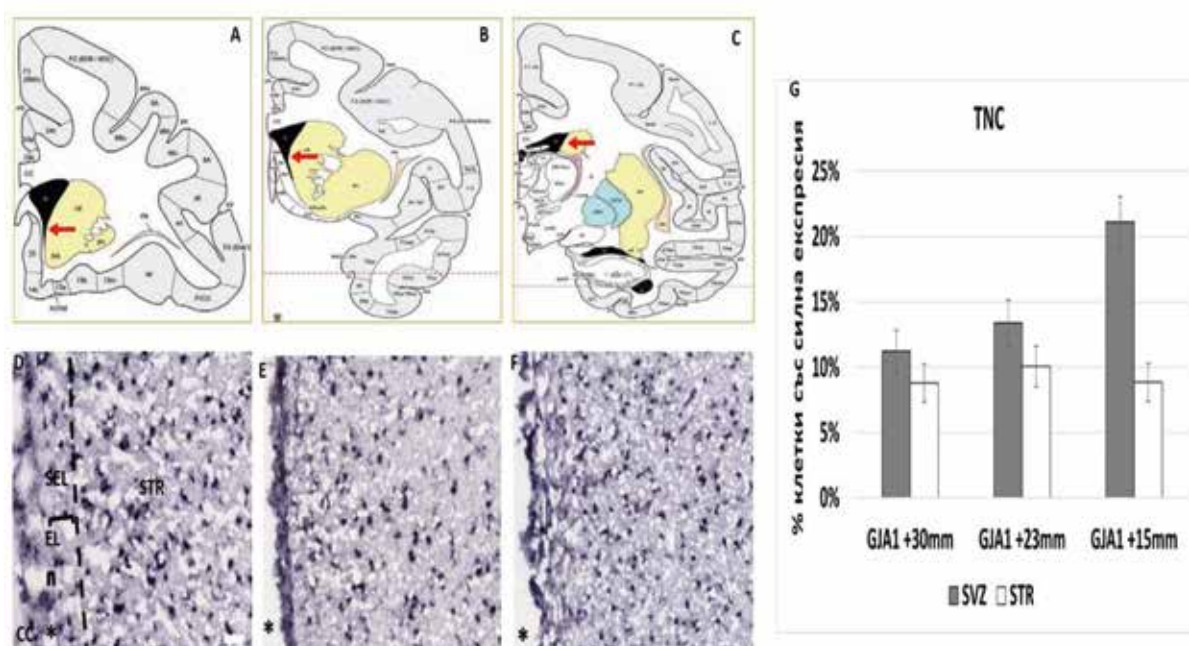
(А). На (А) се наблюдава SVZ, съдържаща EL и SEL при контролно животно. Наблюдава се умерена ISH експресиия както в EL, така и в aSVZ. (В). Увеличение на обозначената зона от А. Наблюдават се единични клетки в SEL (черна стрелка) и умерено наличие на mRNA по цялата дължина на епендимата. (С–D). Оцветяване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

С * е отбелязан латералният вентрикул.

6.6. Ростро-каудална експресиия на TNC

В най-ростралните нива на вентрикула експресиията в SVZ е приблизително толкова, колкото и в striatum (проксимално: SVZ – 11% спрямо STR – 9%) (SVZ – 11%, 95% интервал на доверителност 9.56 – 12.85%; STR – 9%, 95% интервал на довери-

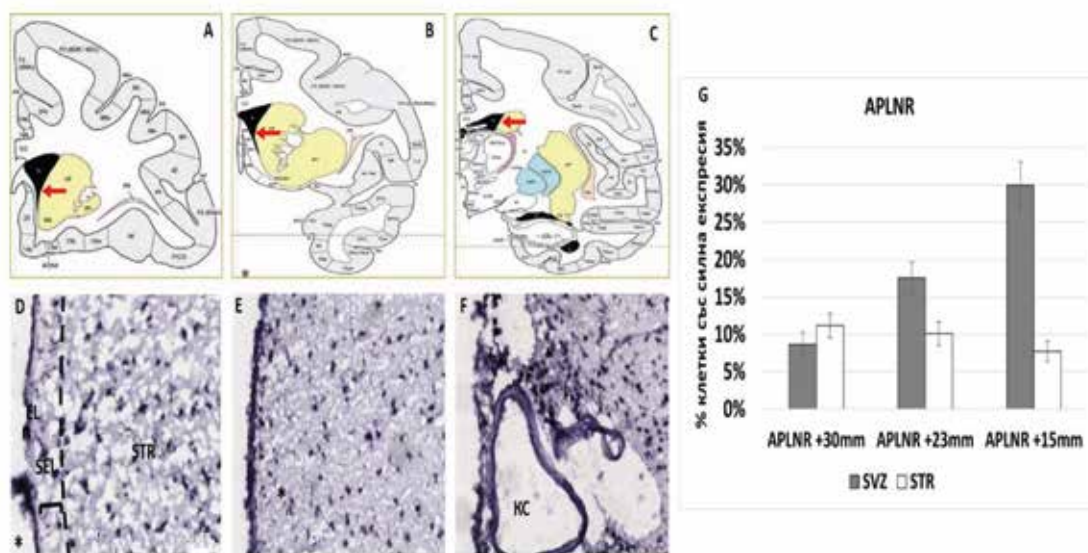
телност 7.32 – 10.24%) (Фиг. 19). В средните нива обаче експресията на TNC в SEL нараства и достига нива, значително по-високи, отколкото в striatum и в най-ростралните части на SVZ (средна: SVZ – 13% спрямо STR – 10%) (SVZ – 13%, 95% интервал на доверителност 11.60 – 15.12%; STR – 9%, 95% интервал на доверителност 8.49 – 11.60%). В най-каудалната част експресията е многократно по-висока в сравнение със стриаталната на същото ниво и тази в по-ростралните участъци (дистално: SVZ – 21% спрямо STR – 9%) (SVZ – 21%, 95% интервал на доверителност 19.18 – 23.07%; STR – 9%, 95% интервал на доверителност 7.38 – 10.31%). Експресията на TNC, както и при APLNR показва засилване присъствието на гена в роетро-каудална посока.



Фиг. 19: Експресия на TNC по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на: (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². (D–F) In situ хибридизация за TNC в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm; (G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на TNC в SEL и striatum на трите нива.

6.7. Ростро-каудална експресия на APLNR

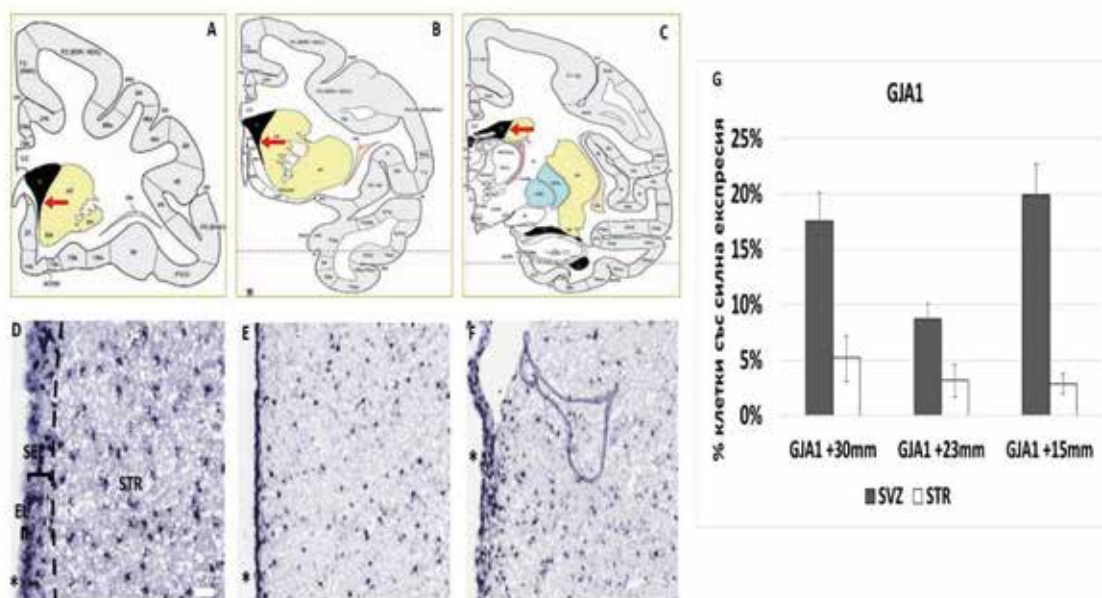
Нашите резултати показват, че в най-ростралните нива на вентрикула силата на експресия на APLNR в SVZ е близка до тази в striatum (проксимално: SVZ – 9% спрямо STR – 11%) (SVZ – 9%, 95% интервал на доверителност 6.95 – 10.33%; STR – 11%, 95% интервал на доверителност 9.52 – 12.78%) (Фиг. 20). В средните нива обаче експресията на APLNR в SVZ е значително по-силна, отколкото в striatum (средна: SVZ – 18% спрямо STR – 10%) (SVZ – 9%, 95% интервал на доверителност 15.38 – 19.66%; STR – 10%, 95% интервал на доверителност 8.49 – 11.67%) и в най-каудалния участък тя нараства многократно в сравнение със експресията в striatum (средна: SVZ – 30% спрямо STR – 8%) (SVZ – 30%, 95% интервал на доверителност 26.83 – 33.08%; STR – 8%, 95% интервал на доверителност 6.33 – 9.09%).



Фиг. 20: Експресия на APLNR по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на: (A) +30 mm; (B) +23 mm; (C) +15 mm, по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². (D–F) In situ хибридизация за APLNR в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm; (G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на APLNR в SEL и striatum на трите нива.

6.8. Ростро-каудална експресия на GJA1

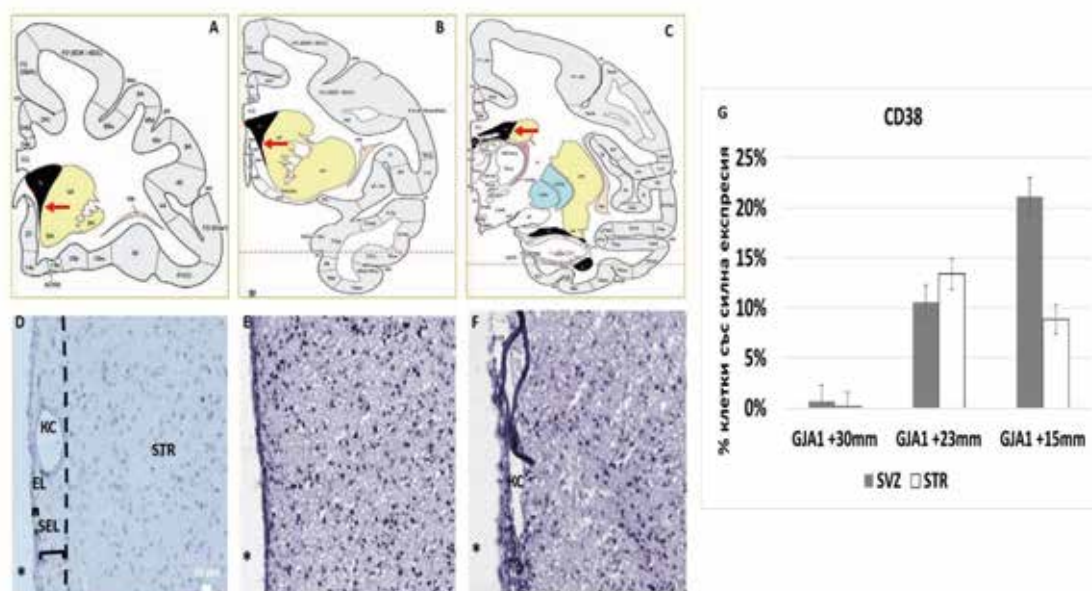
От направените експерименти установихме, че експресията на GJA1 в SVZ в най-ростралните и в най-каудалните нива е приблизително една и съща (Фиг. 21) (проксимално: SVZ – 18% спрямо STR – 5%) (SVZ – 18%, 95% интервал на доверителност 14.86 – 20.13%; STR – 5%, 95% интервал на доверителност 2.58 – 6.68%), (дистално: SVZ – 20% спрямо STR – 3%) (SVZ – 20%, 95% интервал на доверителност 17.01 – 22.71%; STR – 3%, 95% интервал на доверителност 1.91 – 3.78%) (Фиг. 20). В средните нива се забелязват по-ниски нива на експресия в сравнение с ростралните и каудалните (среда: SVZ – 9% спрямо STR – 3%) (SVZ – 9%, 95% интервал на доверителност 7.34 – 10.08%; STR – 3%, 95% интервал на доверителност 1.65 – 4.58%). Откриват се обаче повишени нива на експресия на гена в SVZ спрямо стриатума.



Фиг. 21: Експресия на GJA1 по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на: (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm, по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². (D–F) In situ хибридизация за GJA1 в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm (G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на GJA1 в SEL и striatum на трите нива.

6.9. Ростро-каудална експресия на CD38

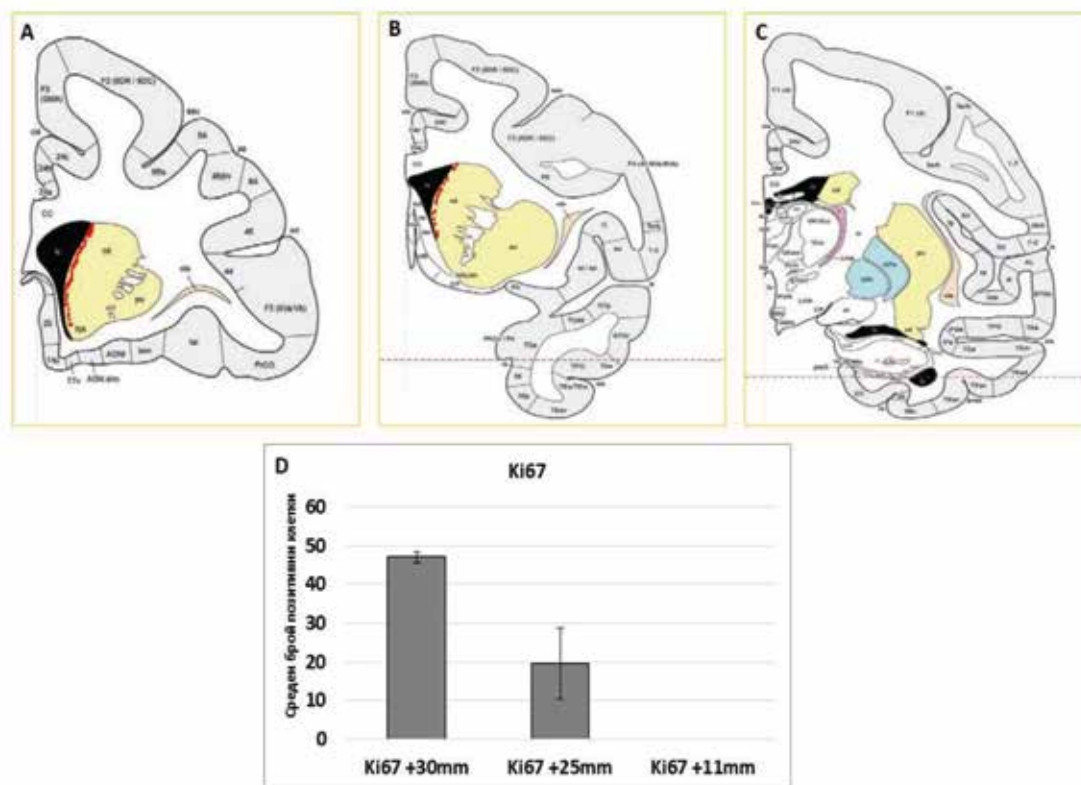
От получените данни виждаме ясен ростро-каудален градиент на експресия на GJA1. Откриват се много ниски нива на експресия в най-ростралните нива в стриатума, както и в SVZ (проксимално: SVZ – 1% спрямо STR – 0%) (SVZ – 1%, 95% интервал на доверителност 0.23 – 1.06%; STR – 0%, 95% интервал на доверителност 0.34 – 0.26%). В средните нива тя е еднаква (срещна: SVZ – 11% спрямо STR – 13%) (SVZ – 11%, 95% интервал на доверителност 8.83 – 12.28%; STR – 13%, 95% интервал на доверителност 11.07 – 15.67%), докато в най-каудалните се наблюдава многократно увеличение на експресията в SEL със сравнително ниски нива в стриатума (дистално: SVZ – 21% спрямо STR – 9%) (SVZ – 21%, 95% интервал на доверителност 19.18 – 23.05 %; STR – 9%, 95% интервал на доверителност 7.36 – 10.30%) (Фиг. 22).



Фиг. 22: Експресия на CD38 по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на: (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm по: „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². (D–F) In situ хибридизация за CD38 в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm (G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на CD38 в SEL и striatum на трите нива.

6.10. Ростро-каудален градиент в пролиферативната активност в SVZ

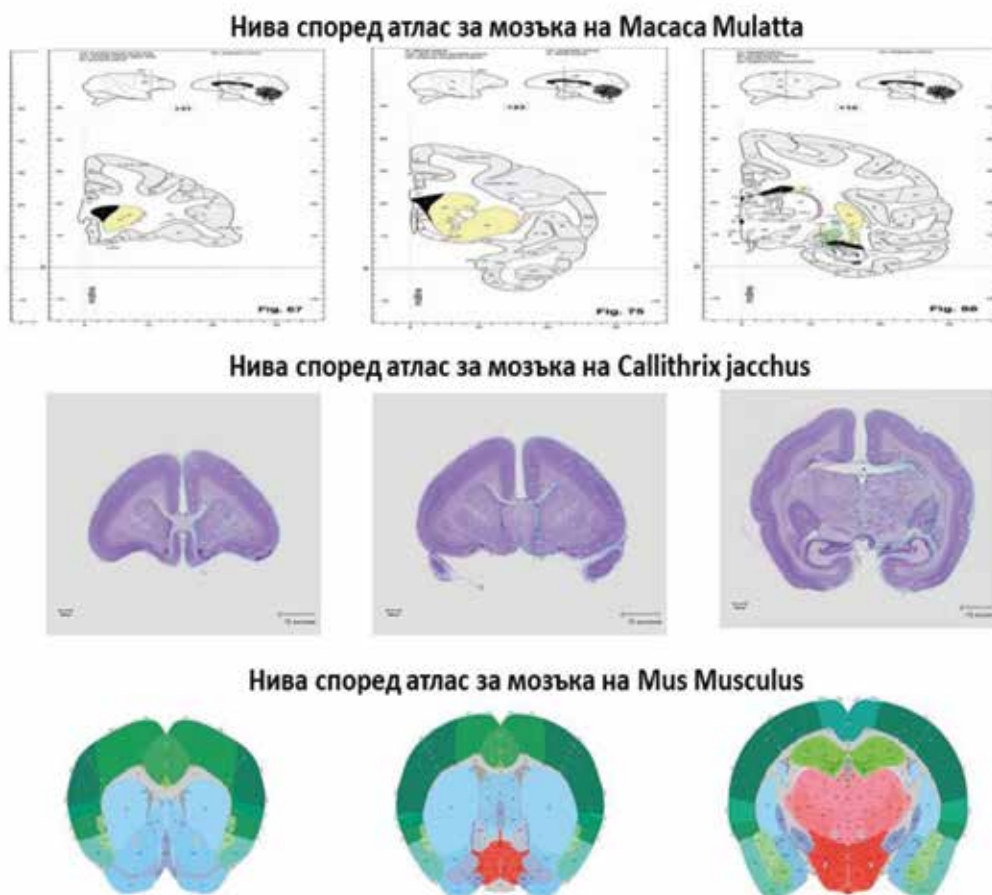
За да разберем дали има разлика по отношение на пролиферацията в трите зони, използвахме имунохистохимична детекция за Ki67. Поради малкото количество позитивни клетки (<50), те бяха изброени по цялата дължина на вентрикула на три различни нива (Фиг. 23). Въз основа на получените резултати установихме, че средният брой на позитивните клетки намалява от рострално към каудално, като на последното ниво не се откриват пролиферативни клетки. В най-ростралната част (+30 mm) наблюдавахме средно 47 позитивни клетки, докато в средната част (+23 mm) наблюдавахме средно 19.5 клетки. Позитивни клетки не бяха наблюдавани в най-каудалната част на вентрикула.



Фиг. 23: Експресия на Ki67 по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на: (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm, по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². Всяка позитивна клетки е показана като червена точка. (D) Среден брой Ki67+ клетки на нивата (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm¹²²

6.11. Сравнение на ростро-каудалната експресия на избраните гени при различни бозайници

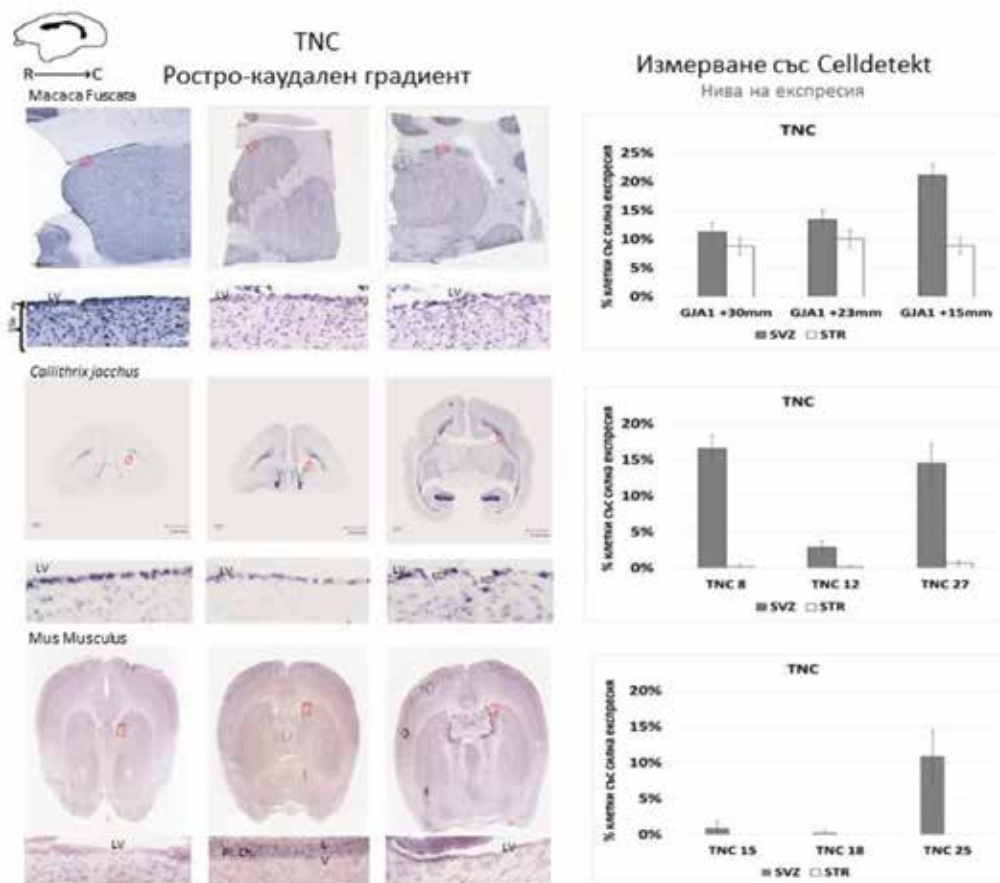
За да разберем дали има разлика в експресията на избраните от нас гени при различни бозайници (грязач, маймуна от Новия свят и маймуна от Стария свят), използвахме отворени бази данни, съдържащи информация за генната експресия на четирите гена на три коронарни нива, отговарящи съответно на най-ростралната част на вентрикула (+30)¹²², средата (+23)¹²² и най-каудалната част (+15)¹²² (Фиг. 24). За ориентир бяха използвани различни анатомични маркери (например мястото на отваряне на трети вентрикул). Околичествихме експресията на гените чрез полуавтоматично преброяване на позитивните клетки чрез софтуера CellDetekt по цялата дължина на вентрикула при трите вида. Данните за *Callithrix jacchus* бяха взети от ISH атлас на Institute of Physical and Chemical Research (Riken), Япония (Marmoset Gene Atlas (brainminds.jp)). Данните за *Mus musculus* бяха взети от ISH атлас на Allen Institute for Brain Science, USA (дата на изтегляне на файловете: 20.03.2021 г.).



Фиг. 24: Представени са различните ростро-каудални нива, използвани за измерването на генната експресия в SVZ според атласи на макакски, мармозетски и миши мозък^{118, 122, 142}

6.12. Сравнение на ростро-каудалната експресия на TNC при различни бозайници

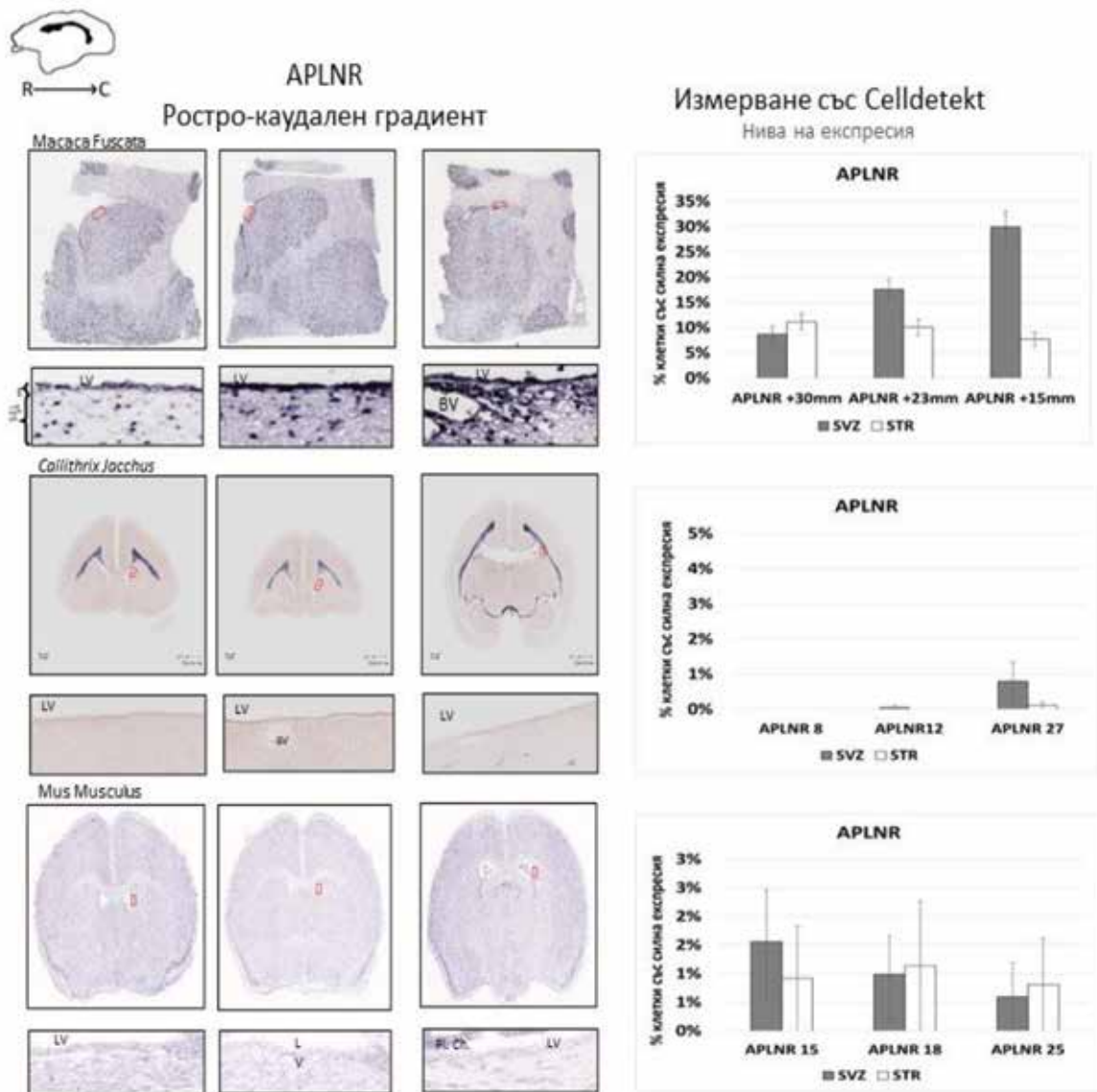
Експресията на TNC при *Macaca mullata* е с изразен ростро-каудален градиент на нарастване (SVZ – 11%, 95% интервал на доверителност 9.56 – 12.85%; SVZ – 13%, 95% интервал на доверителност 11.60 – 15.12%; SVZ – 21%, 95% интервал на доверителност 19.18 – 23.07%), докато при мармозетката TNC е по-силно експресиран в ростралната част на вентрикула, намалява в средната част и отново се покачва в каудалната част, където обаче е малко по-ниска, отколкото на ростралните нива (Фиг. 25), (SVZ – 10%, 13%, 21%; SVZ – 10%, 95% интервал на доверителност 14.70 – 18.39%; SVZ – 13%, 95% интервал на доверителност 1.93 – 3.73%; SVZ – 21%, 95% интервал на доверителност 11.67 – 17.19%). При гризачи експресията е по-различна, като се наблюдават извънредно ниски нива на експресия в най-ростралните и средните нива и силна експресия в най-каудалните нива (ростро-каудално: SVZ – 0%, 0%, 1% (SVZ – 1%, 95% интервал на доверителност 7.11 – 14.46%; SVZ – 0.3%, 95% интервал на доверителност 0.45 – 0.57%; SVZ – 11%, 95% интервал на доверителност 0.46 – 1.84%).



Фиг. 25: Сравнение на генната експресия на TNC при три бозайника

6.13. Сравнение на ростро-каудалната експресия на APLNR при различни бозайници

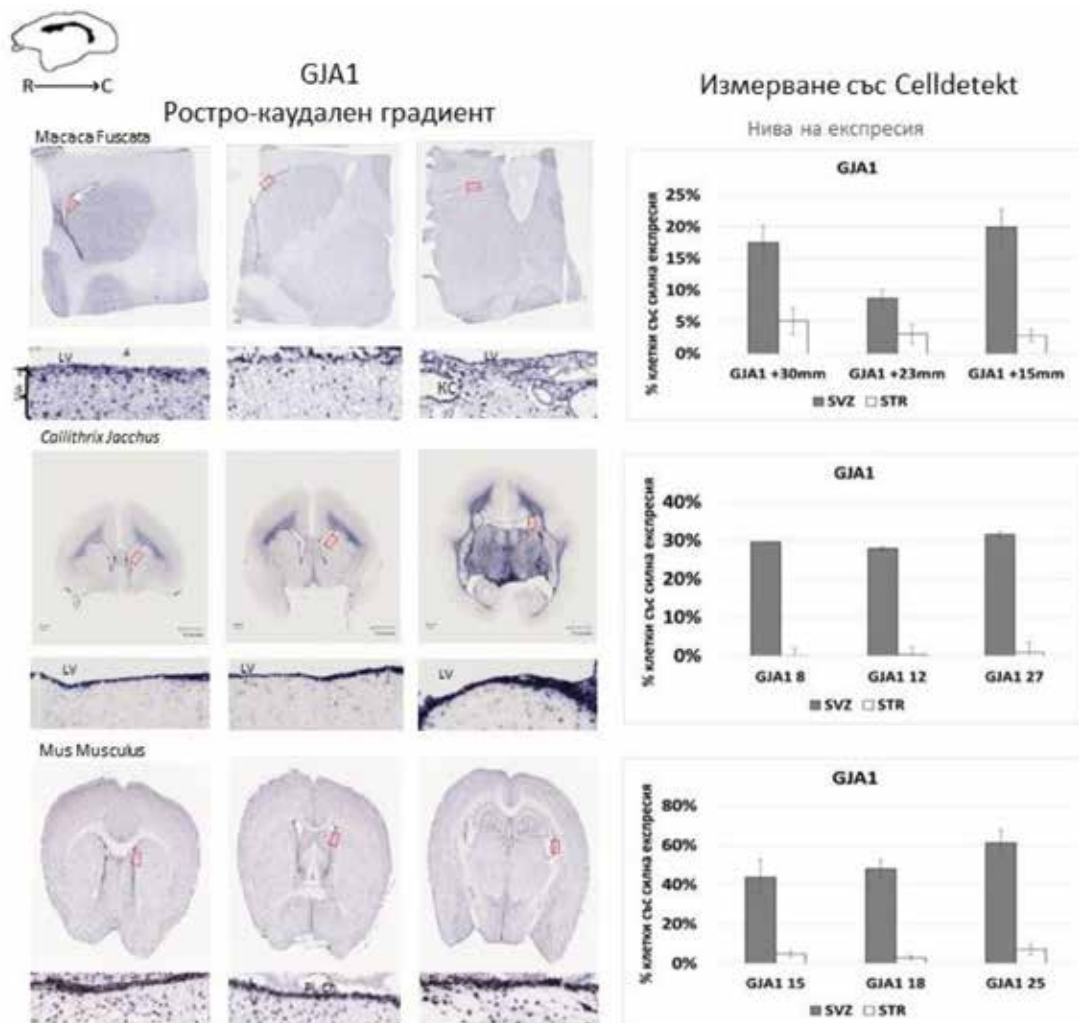
При сравнение на генната експресия за APLNR между отделните видове (*Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus* и *Mus musculus*) забелязахме, че при *Callithrix jacchus* експресията се свежда до единични позитивни клетки (SVZ – 0%, 0.05%, 1%, SVZ – 0%, 95% интервал на доверителност 0 – 0%; SVZ – 0.05%, 95% интервал на доверителност -0.08 – 0.10%; SVZ – 1%, 95% интервал на доверителност 0.13 – 1.34%), а при *Mus musculus* се откроява повсеместно слаба експресия – както в SVZ, така и в EL (SVZ – 2%, 1%, 1%; SVZ – 2%, 95% интервал на доверителност 0.50 – 2.47%; SVZ – 1%, 95% интервал на доверителност 0.18 – 1.66%; SVZ – 1%, 95% интервал на доверителност – 0.30 – 1.19%) (Фиг. 26).



Фиг. 26: Сравнение на генната експресия на APLNR при три бозайника

6.14. Сравнение на ростро-каудалната експресия на GJA1 при различни бозайници

Експресията на GJA1 при отделните видове показва следните особености: наличие на сравнително еднаква експресия за гена при избраните нива от *Callitrix jacchus* (SVZ ростро-каудално – 30%, 28%, 32%; SVZ – 30%, 95% интервал на доверителност 27.73 – 31.61%; SVZ – 28%, 95% интервал на доверителност 26.96 – 29.84%; SVZ – 32%, 95% интервал на доверителност – 28.79 – 34.36%), докато при *Mus musculus* делът на силно експресиращи клетки варира от 40% в най-ростралните части на вентрикула до 70% в най-каудалните (SVZ ростро-каудално – 44%, 48%, 61%; SVZ – 44%, 95% интервал на доверителност 34.78 – 52.56%; SVZ – 48%, 95% интервал на доверителност 43.49 – 52.71%; SVZ – 61%, 95% интервал на доверителност – 54.82 – 67.67%) (Фиг. 27). Както вече беше отбелязано, експресията при *Macaca mulatta* е със сравнително еднакви нива в най-ростралната и най-каудалната част на вентрикула, докато в средната част тя е малко по-ниска.



Фиг. 27: Сравнение на генната експресия на GJA1 при три бозайника

6.15. Сравнение на ростро-каудалната експресия на CD38 при различни бозайници

Поради отсъствие на данни за експресията на CD38 при *Callithrix jacchus* и наличие на данни при *Mus musculus*, но за сагитални срези на мозъка, околичествяване на експресията не беше осъществено.

6.16. Фенотипен анализ на избраните гени

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

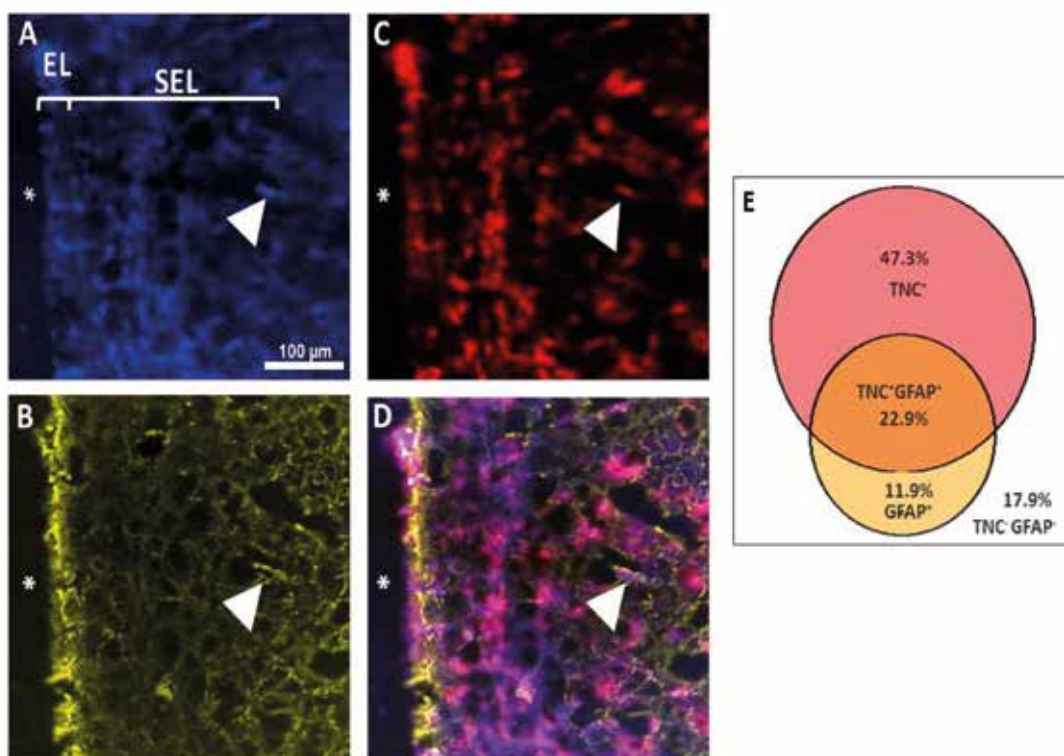
За тази цел използвахме следните флуоресцентни имунохистохимични или FISH оцветявания в съчетание с FISH за съответните гени на интерес:

1. GFAP (Glial fibrillary acidic protein) беше използван като маркер за qNSCs, aNSCs и паренхимни астроцити.
2. Vimentin беше използван като маркер за aNSCs, TAPs и ендотел.
3. BrdU (5-бромо-2'-дезоксиуридин) беше използван като маркер за дялящи се клетки. Поради характера на апликацията на BrdU при експерименталните животни BrdU ще се инкорпорира главно в бързо дялящите се клетки от типа TAPs и в някои дялящи се aNSCs.
4. За характеризиране на APLNR⁺ популацията беше използван и GLUT1 (Glucose transporter 1) за бележене на кръвоносни съдове.

6.16.1. Фенотипен анализ на TNC (Tenascin-C)

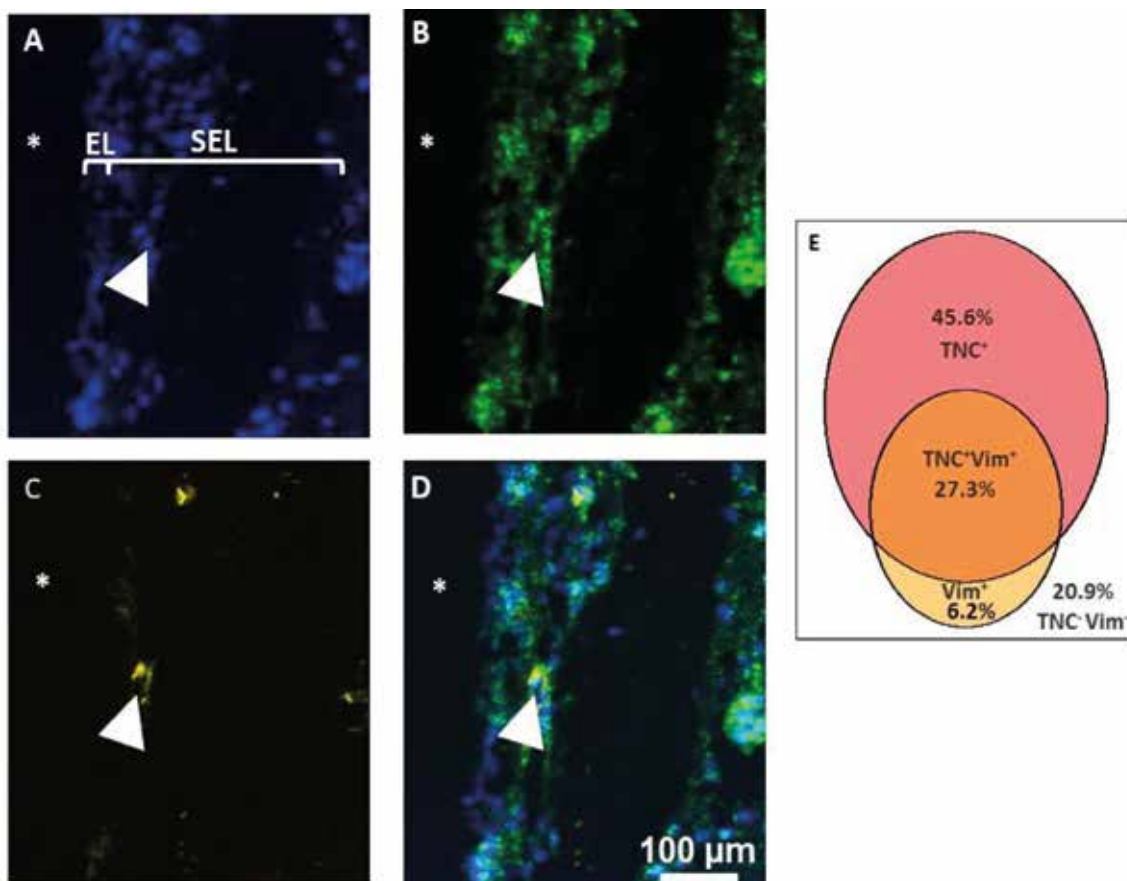
Беше направено имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за TNC. Оцветяванията ни показаха наличие на TNC⁺/GFAP⁺ (22.9% от всички клетки в aSVZ), TNC⁺/Vimentin⁺ (27.3%) и TNC⁺/BrdU⁺ (1.4%) клетки.

От двойните оцветявания с GFAP и TNC установихме, че единично позитивните за TNC клетки представляват 47.3%. (Средно 47.3, 95% интервал на доверителност 43.5 – 52.2%) от всички DAPI⁺ клетки, докато TNC⁻/GFAP⁺ клетки представляват 11.9% (95% интервал на доверителност 8.41 – 13.97%) от всички клетки (DAPI⁺), докато двойнонегативната субпопулация GFAP⁻TNC⁻ представлява 17.8% (95% интервал на доверителност 14.01 – 20.60%) (Фиг. 28). В допълнение, резултатите показват, че 32% от всички TNC⁺ клетки са двойнопозитивни за GFAP (95% интервал на доверителност 28.15 – 37.87%) и 66% от всички GFAP⁺ клетки са позитивни за TNC (95% интервал на доверителност 60.45 – 74.42%).



Фиг. 28: (A–D) Оцветяване за mRNA на TNC (C) (червено) в комбинация с GFAP (B) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна (TNC⁺/GFAP⁺) клетка. С * е отбелязан вентрикуларният лумен. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GFAP⁺, TNC⁺, GFAP⁺/TNC⁺ и GFAP⁻/TNC⁻. Цифрите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

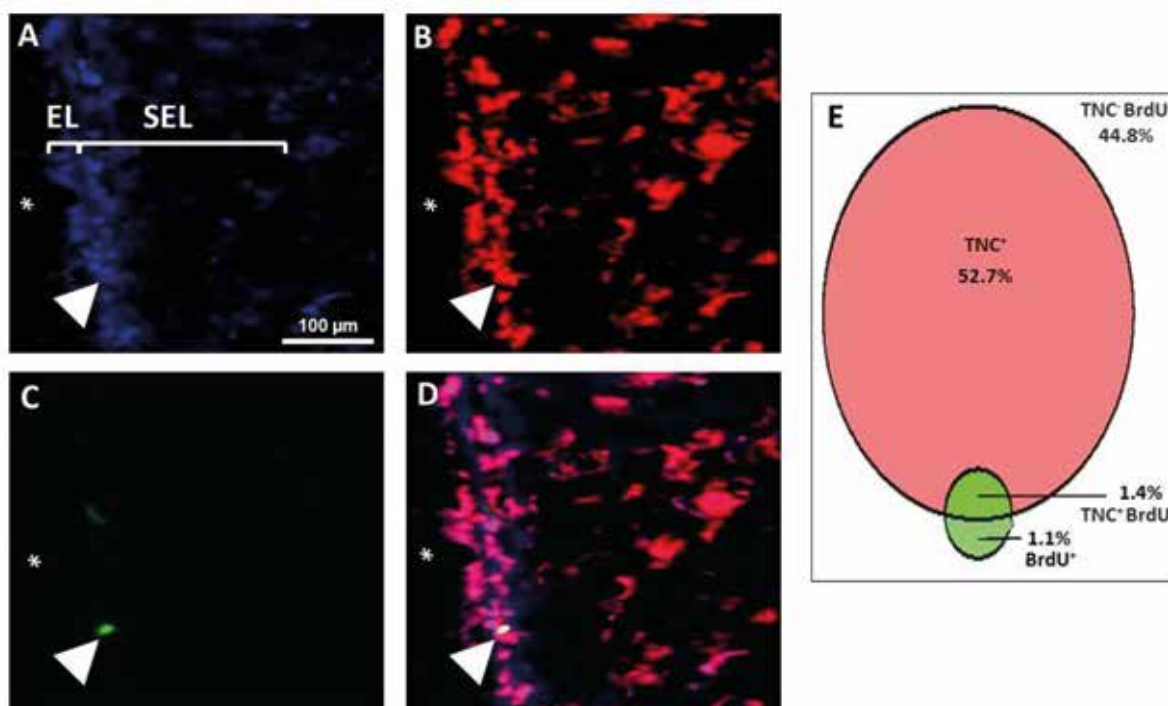
При оцветяване с маркера за aNSCs, TAPs и кръвоносни съдове Vimentin установихме, че единично позитивните за TNC клетки представляват 45.6% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 39.82 – 51.61%), а за Vimentin – 6.2% (95% интервал на доверителност 3.13 – 8.87%) (Фиг. 29). От друга страна, двойно-позитивната субпопулация от Vimentin⁺/TNC⁺ клетки представлява 27.3% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 21.42 – 32.14%). Негативната субпопулация Vimentin⁻/TNC⁻ представлява 20.9% (95% интервал на доверителност 16.28 – 25.99%). В допълнение, 37% от TNC⁺ клетки са двойнопозитивни за Vimentin (95% интервал на доверителност 29.96 – 43.52%) и 81% от Vimentin⁺ клетки експресират TNC (95% интервал на доверителност 74.45 – 90.42%).



Фиг. 29: (A–D) Оцветяване за иРНК на TNC (B) (зелено) в комбинация с Vimentin (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна (TNC⁺/GFAP⁺) клетка. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: Vimentin⁺, TNC⁺, Vimentin⁺/TNC⁺ и Vimentin⁻/TNC⁻ от всички клетки. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

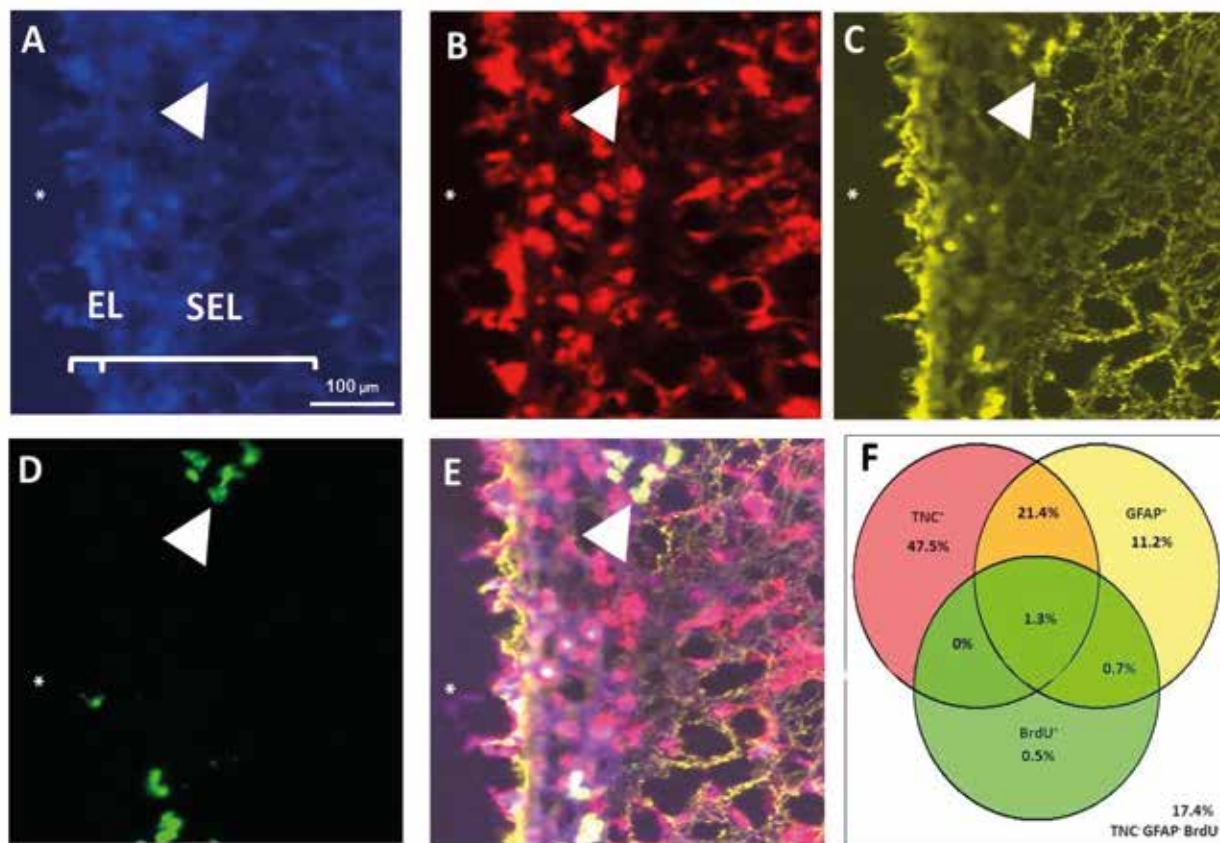
С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

За да проследим наличието на de novo генерирани клетки в тази зона, използвахме протокол за инфузия на BrdU и последващо имунохистохимично оцветяване за BrdU и FISH за TNC. От изброените клетки установихме, че единично позитивните за TNC клетки представляват 52.7% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 49.48 – 54.02%), докато единично позитивните за BrdU представляват 1.1% (95% интервал на доверителност 0.60 – 1.53%). Двойнопозитивната субпопулация от BrdU⁺/TNC⁺ клетки представлява 1.4% от всички DAPI⁺ (95% интервал на доверителност 0.93 – 1.99%), докато двойнонегативната субпопулация BrdU⁻/TNC⁻ представлява 44.9% (95% интервал на доверителност 43.48 – 47.96%) (Фиг. 30). Също така само 3% от всички TNC⁺ клетки са позитивни и за BrdU (95% интервал на доверителност 1.67 – 3.61%), докато 56% от всички BrdU⁺ клетки са позитивни за TNC (95% интервал на доверителност 43.52 – 71.93).



Фиг. 30: (A–D) Оцветяване за mRNA на TNC (B) (червено) в комбинация с BrdU (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна за TNC⁺/BrdU⁺ клетка. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: BrdU⁺, TNC⁺, BrdU⁺/TNC⁺ и BrdU⁻/TNC⁻. Цифрите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С* е отбелязан вентрикуларният лумен.

За да разберем дали има пролифериращи GFAP⁺/TNC⁺ клетки, направихме и двойно имунохистохимично оцветяване за GFAP и BrdU в комбинация с FISH за TNC (Фиг. 31). От резултатите се вижда, че само 1.3% от всички DAPI⁺ са тройнопозитивни клетки (TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺).



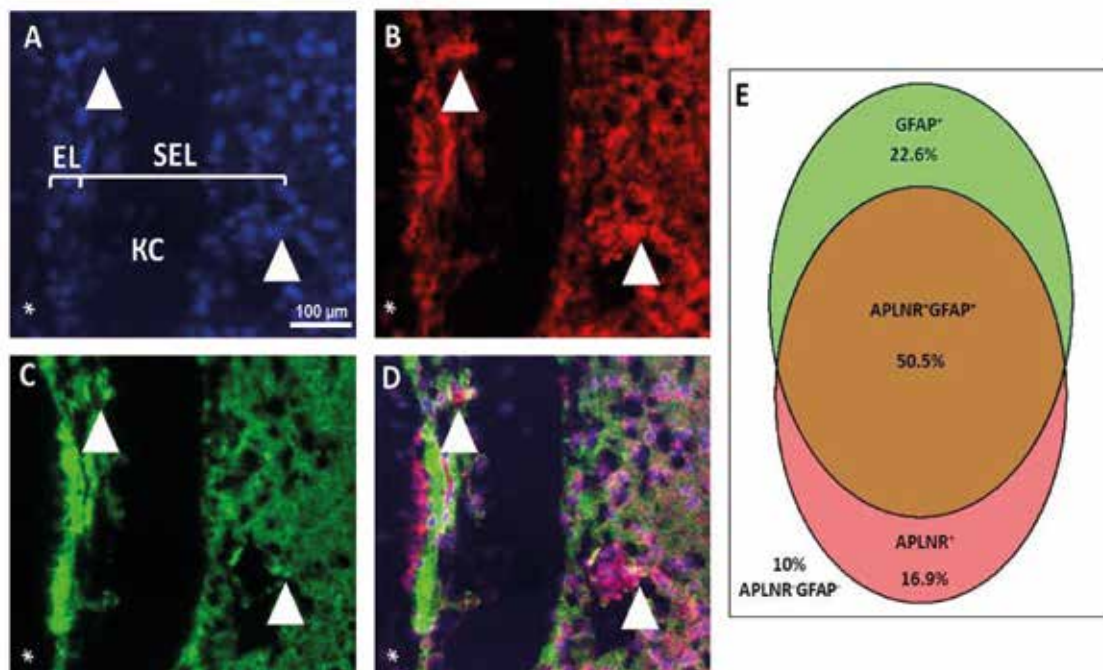
Фиг. 31: (А–Е) Оцветяване за mRNA на TNC (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (жълто) и BrdU (D) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка: TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺.

(F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: BrdU⁺, TNC⁺, GFAP⁺, BrdU⁺/TNC⁺, GFAP⁺/TNC⁺, GFAP⁺/BrdU⁺, TNC⁺/GFAP⁺/BrdU⁺ и TNC⁻/GFAP⁻/BrdU⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

6.16.2. Фенотипен анализ на APLNR

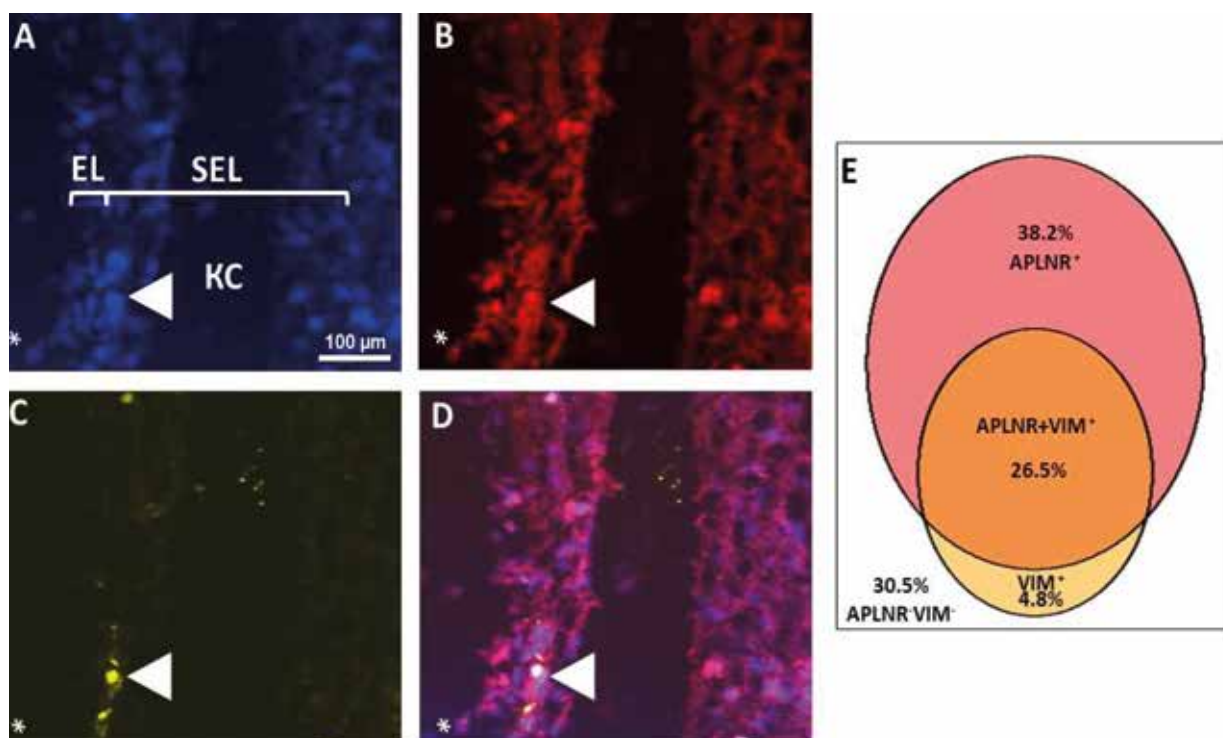
Беше направено флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin, BrdU и Glut1 в различни комбинации с FISH за APLNR. Оцветяванията ни показаха наличие на APLNR⁺/GFAP⁺ (50.5% от всички клетки), APLNR⁺/Vimentin⁺ (26.5%), APLNR⁺/BrdU⁺ (1.9%) и APLNR⁺/Glut1⁺ (12.2%) клетки.

От двойните оцветявания с GFAP и APLNR установихме, че единично позитивните за APLNR клетки представляват 16.9% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 14.09 – 22.69%), докато единично позитивните за GFAP клетки са 22.6% (95% интервал на доверителност 16.98 – 26.50%). Двойнопозитивната субпопулация от GFAP⁺APLNR⁺ клетки представлява 50.5% от всички DAPI⁺ (95% интервал на доверителност 43.27 – 54.78%), а двойнонегативната субпопулация GFAP⁻/APLNR⁻ представлява 10% (95% интервал на доверителност 7.06 – 13.97%) (Фиг. 32). В допълнение, резултатите показват, че 74.8% от всички APLNR⁺ клетки са двойнопозитивни за GFAP (95% интервал на доверителност 66.74 – 78.93%), а 69% от всички GFAP⁺ клетки са позитивни за APLNR (95% интервал на доверителност 62.84 – 75.38%).



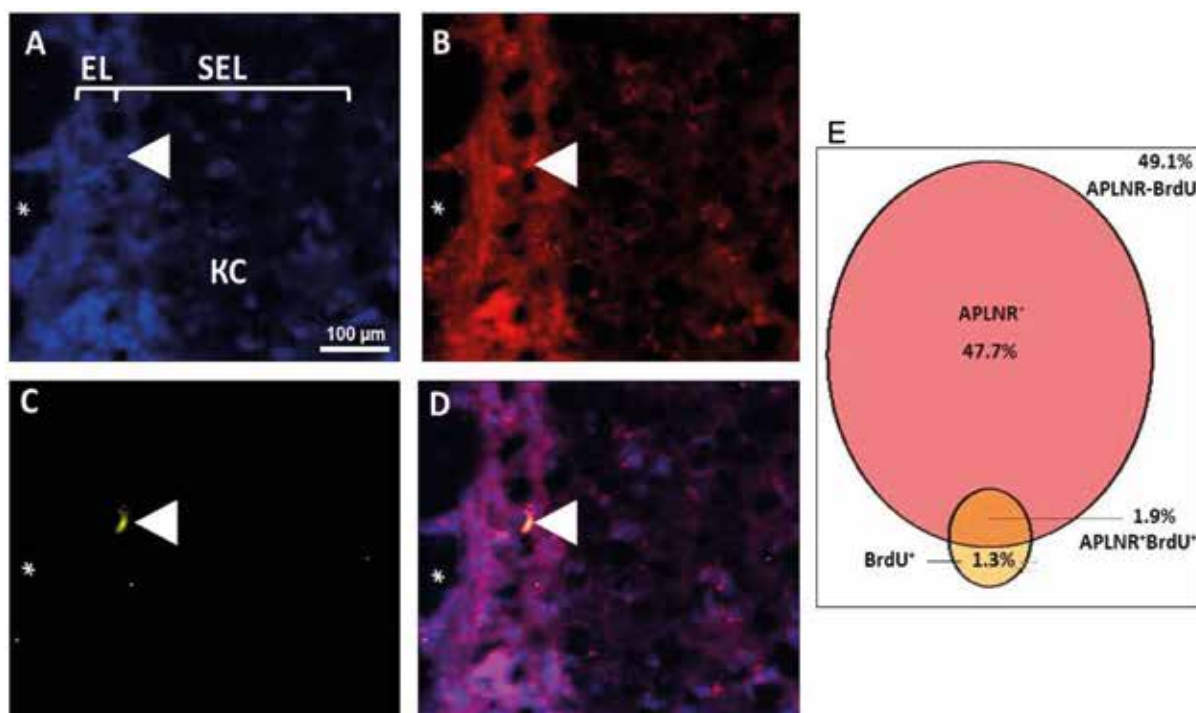
Фиг. 32: (A–D) Оцветяване за mRNA на APLNR (B) (червено) в комбинация с GFAP (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки APLNR⁺/GFAP⁺. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, GFAP⁺, APLNR⁺/GFAP⁺ и APLNR⁻/GFAP⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

При оцветяване за Vimentin (маркер за aNSCs, TAPs и кръвоносни съдове) в комбинация с FISH за APLNR установихме, че делът на двойнопозитивните клетки е 26.5% от всички клетки (95% интервал на доверителност 24.09 – 34.39%) (Фиг. 33). Единично позитивните за APLNR клетки са 38.2% (95% интервал на доверителност 32.27 – 38.35), а тези за Vimentin са 4.8% (95% интервал на доверителност 4.30 – 6.84%). В допълнение, 40.8% от всички APLNR⁺ експресират Vimentin (95% интервал на доверителност 39.82 – 47.18%) и 85% от всички Vimentin⁺ експресират APLNR (95% интервал на доверителност 80.76 – 88.19%).



Фиг. 33: (A–D) Оцветяване за mRNA на APLNR (B) (червено) в комбинация с Vimentin (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка APLNR⁺/Vim⁺. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Vim⁺, APLNR⁺/Vim⁺ и APLNR⁻/Vim⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

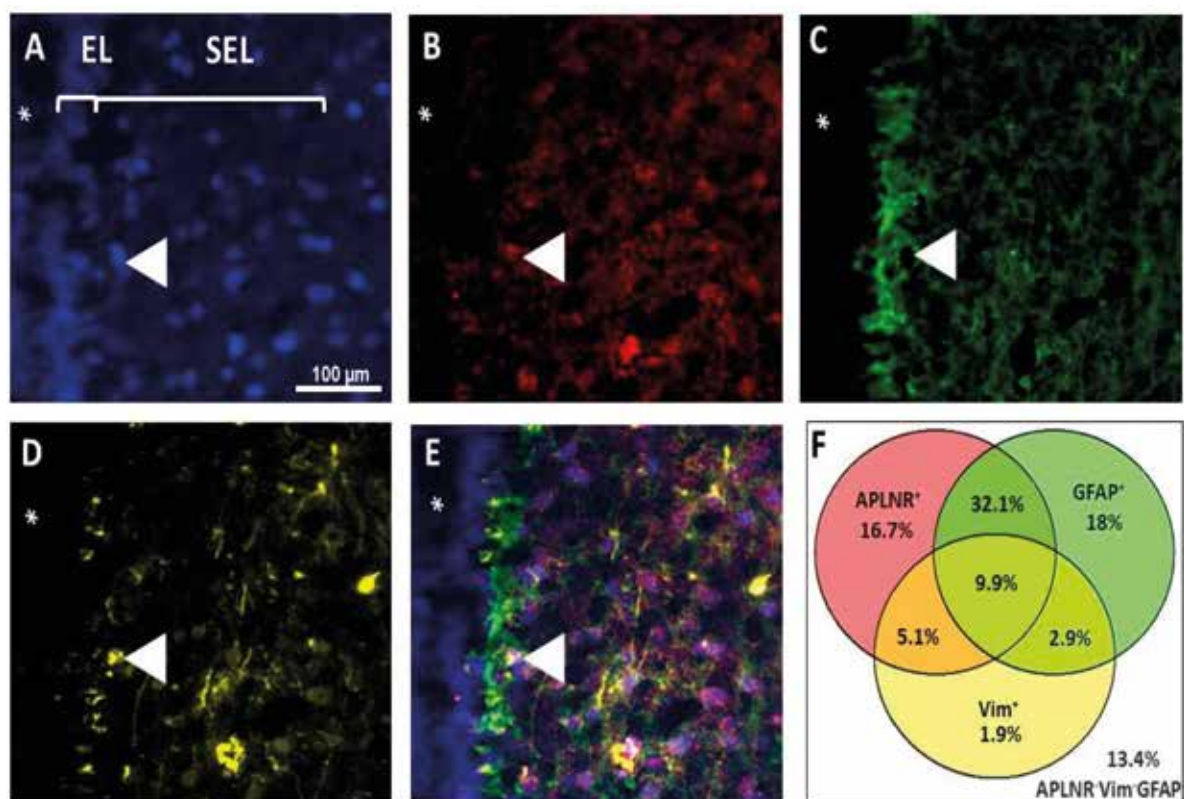
При оцветяване за de novo генерирани клетки с BrdU нашите резултати показват, че 1.9% от всички клетки са двойнопозитивни за APLNR и BrdU (95% интервал на доверителност 0.67 – 2.93%) (Фиг. 4). Единично позитивните клетки за APLNR са 47.7% (95% интервал на доверителност 43.64 – 52.03%), а тези за BrdU са 1.3% (95% интервал на доверителност 0.34 – 2.28%). Само 4% от всички BrdU⁺ клетки са позитивни за APLNR (95% интервал на доверителност 1.78 – 6.27%), докато 57.5% от всички APLNR⁺ са позитивни за BrdU (95% интервал на доверителност 33.56 – 80.39%).



Фиг. 34: (A–D) Оцветяване за mRNA на APLNR (B) (червено) в комбинация с BrdU (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка APLNR⁺/BrdU⁺.

(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, BrdU⁺, APLNR⁺/BrdU⁺ и APLNR⁻/BrdU⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

При тройно оцветяване за APLNR, GFAP и VIM установихме, че тройнопозитивните клетки APLNR⁺/GFAP⁺/VIM⁺ съставляват 9.9% от всички DAPI⁺ клетки (Фиг. 35).

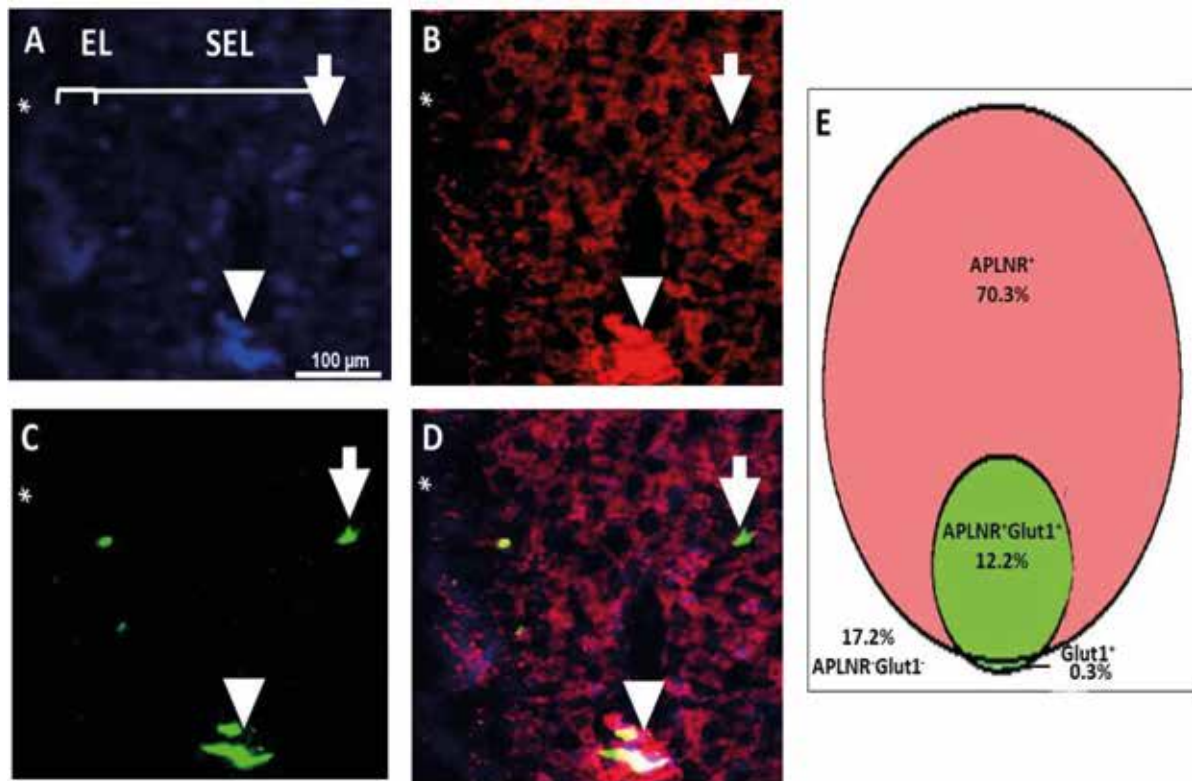


Фиг. 35: (А–Е) Оцветяване за mRNA на APLNR (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (зелено) и Vimentin (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка APLNR⁺/GFAP⁺/Vim⁺. (F) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Vim⁺, GFAP⁺, APLNR⁺/Vim⁺, APLNR⁺/Vim⁺/GFAP⁺ и APLNR⁻/GFAP⁻/Vim⁻ от всички клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

Поради наличие на данни, че APLNR се експресира в кръвоносни съдове^{143,144}, направихме двойно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за Glut1 и Vimentin в комбинация с рибопроба за APLNR (Фиг. 36).

От единичното ни оцветяване за Glut1 и APLNR установихме, че 12.2% от всички DAPI⁺ клетки са двойнопозитивни (95% интервал на доверителност 7.06 – 14.61%). Единично позитивните клетки за APLNR бяха 70.3% (95% интервал на доверителност 64.24 – 74.79%), а тези за Glut1 бяха 0.3% (95% интервал на доверителност

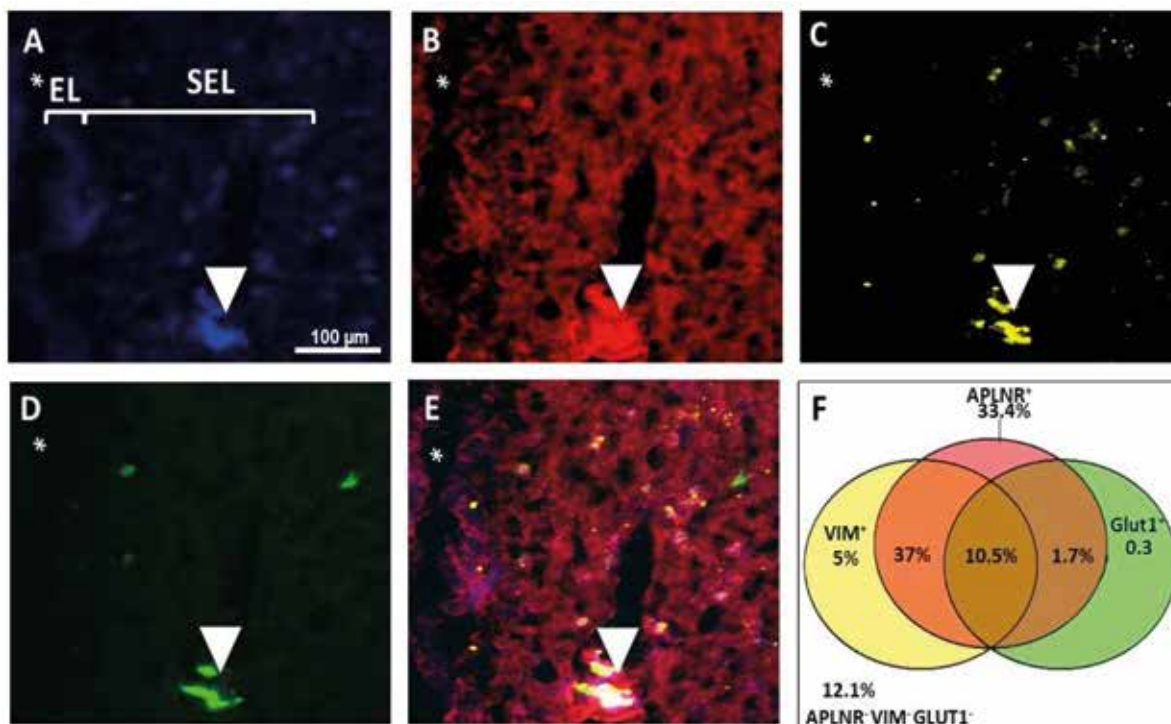
-0.57 – 0.52%). Интересен е фактът, че 98% от $Glut1^+$ са позитивни за APLNR (95% интервал на доверителност 84.21 – 98.91%), а 14.7% от $APLNR^+$ са позитивни за $Glut1$ (95% интервал на доверителност 8.83 – 17.77%).



Фиг. 36: (A–D) Оцветяване за mRNA на APLNR (B) (червено) в комбинация с GLUT1 (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки $APLNR^+/Glut1^+$, а със стрелка е отбелязана $APLNR^-/Glut1^+$ позитивна клетка.

(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: $APLNR^+$, $Glut1^+$, $APLNR^+/Glut1^+$ и $APLNR^-/Glut1^-$. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички $DAPI^+$ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

От резултатите от тройното оцветяване за Vimentin, $Glut1$ и APLNR установихме, че 10.5% от всички $DAPI^+$ клетки са позитивни и за трите маркера (Фиг. 37). Единично позитивните клетки за APLNR бяха 33.4%, тези за $Glut1$ и Vimentin бяха съответно 0.3% и 5%.



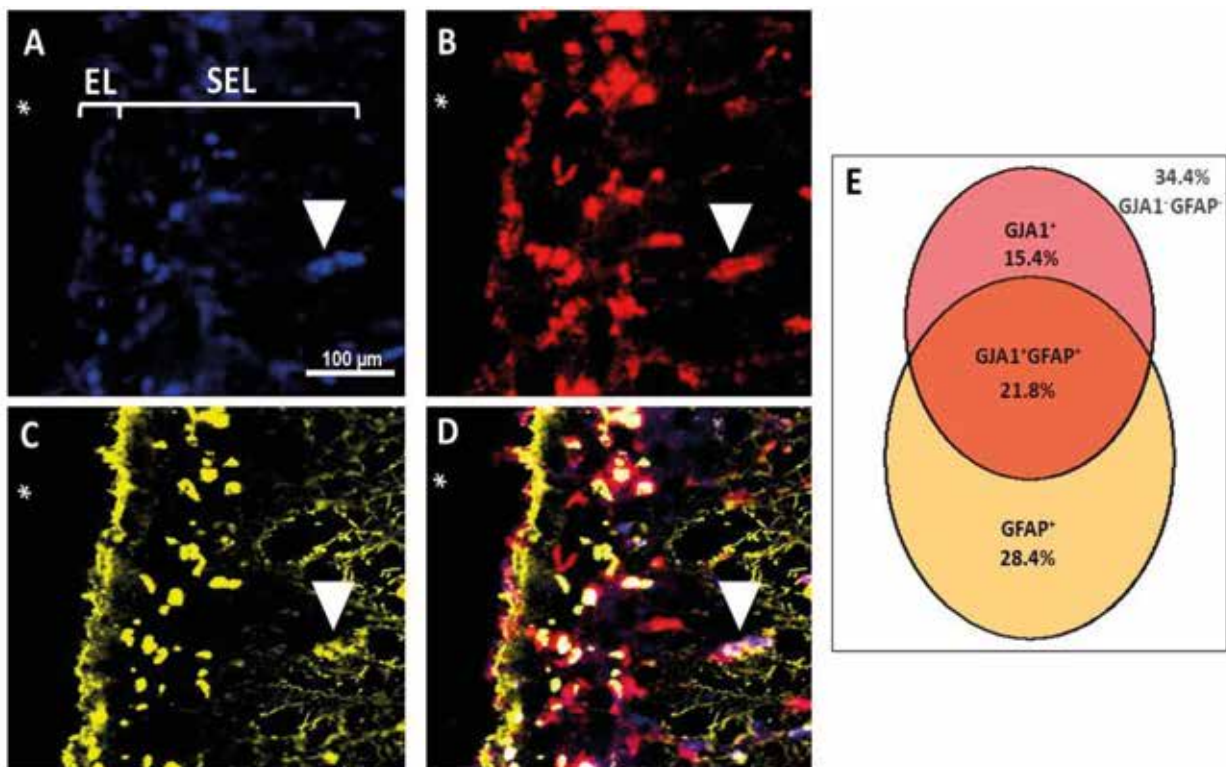
Фиг. 37: (А–Е) Оцветяване за mRNA на APLNR (В) (червено) в комбинация с Vimentin (С) (жълто) и Glut1 (D) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка APLNR⁺/Vim⁺/Glut1⁺. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, Vim⁺, Glut1⁺, APLNR⁺/Vim⁺, APLNR⁺/Glut1⁺, Glut1⁺/Vim⁺, APLNR⁺/Vim⁺/Glut1⁺ и APLNR⁻/Vim⁻/Glut1⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

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

Аналогично беше направен фенотипен анализ на GJA1 с гореописаните маркери. Беше направено флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за GJA1. Оцветяванията ни показаха наличие на GJA1⁺/GFAP⁺, GJA1⁺/Vimentin⁺ и GJA1⁺/BrdU⁺ клетки. Процентното съдържание на двойнопозитивните клетки беше съответно 21.8%, 7% и 2%.

При комбинираното оцветяване за GFAP и GJA1 намерихме, че единично позитивните GJA1 представляват 15.4% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 11.82 – 18.40%), докато единично позитивните GFAP клетки представляват

28.4% от всички DAPI⁺ (95% интервал на доверителност 25.01 – 33.21%). Двойнопозитивната субпопулация от GFAP⁺/GJA1⁺ клетки представлява 21.8% от всички DAPI⁺ (95% интервал на доверителност 17.51 – 25.04%), а двойнонегативната субпопулация GFAP⁻/TNC⁻ представлява 34.4% (95% интервал на доверителност 30 – 38.66%) (Фиг. 38). Допълнителен анализ на резултатите показва, че 58.5% от всички GJA1⁺ експресират GFAP (95% интервал на доверителност 45.92 – 60.64%) и 43% от всички GFAP⁺ експресират GJA1 (95% интервал на доверителност 34.26 – 47.04%).

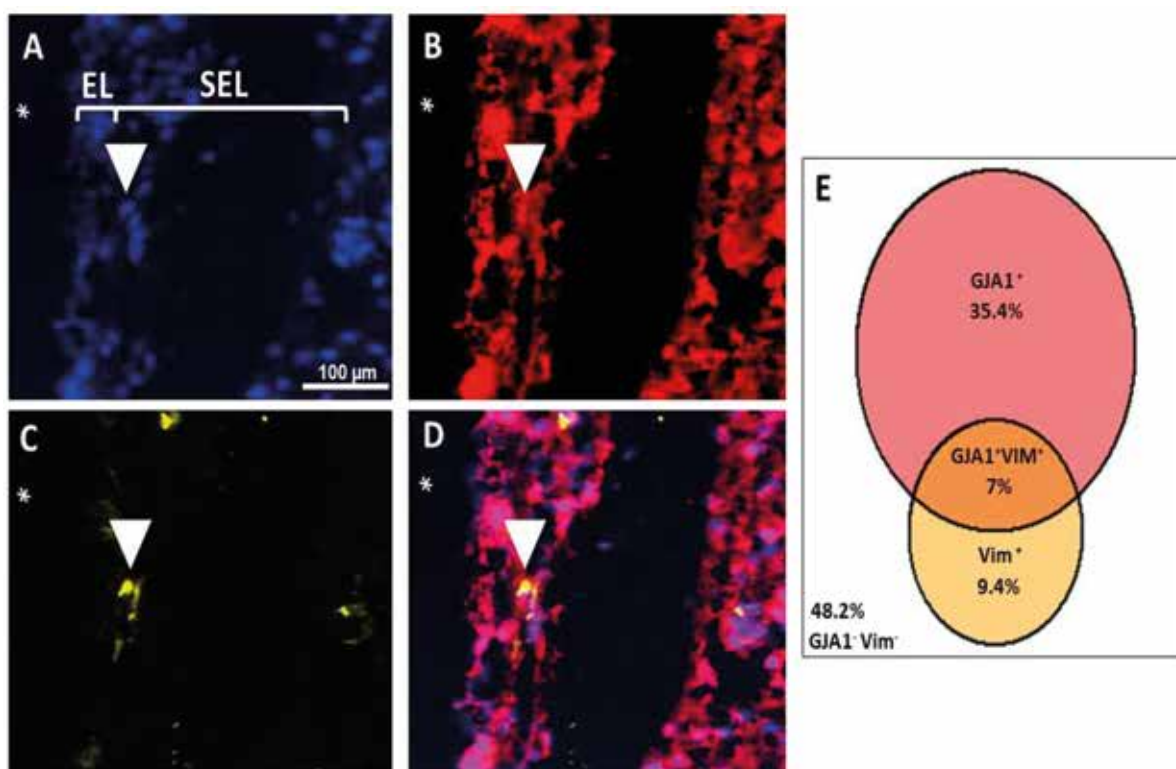


Фиг. 38: (A–D) Оцветяване за mRNA на GJA1 (B) (червено) в комбинация с GFAP (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани две двойнопозитивни клетки GJA1⁺/GFAP⁺.

(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GJA1⁺, GFAP⁺, GJA1⁺/GFAP⁺ и GJA1⁻/GFAP⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

При съчетанието на маркерите Vimentin и GJA1 намерихме, че единично позитивните за GJA1 клетки представляват 35.5% от всички DAPI⁺ клетки (95% интервал на доверителност 31.38 – 39.31%), докато единично позитивните за Vimentin клетки съставляват 9.4% от всички DAPI⁺ (95% интервал на доверителност 6.81 – 11.76%).

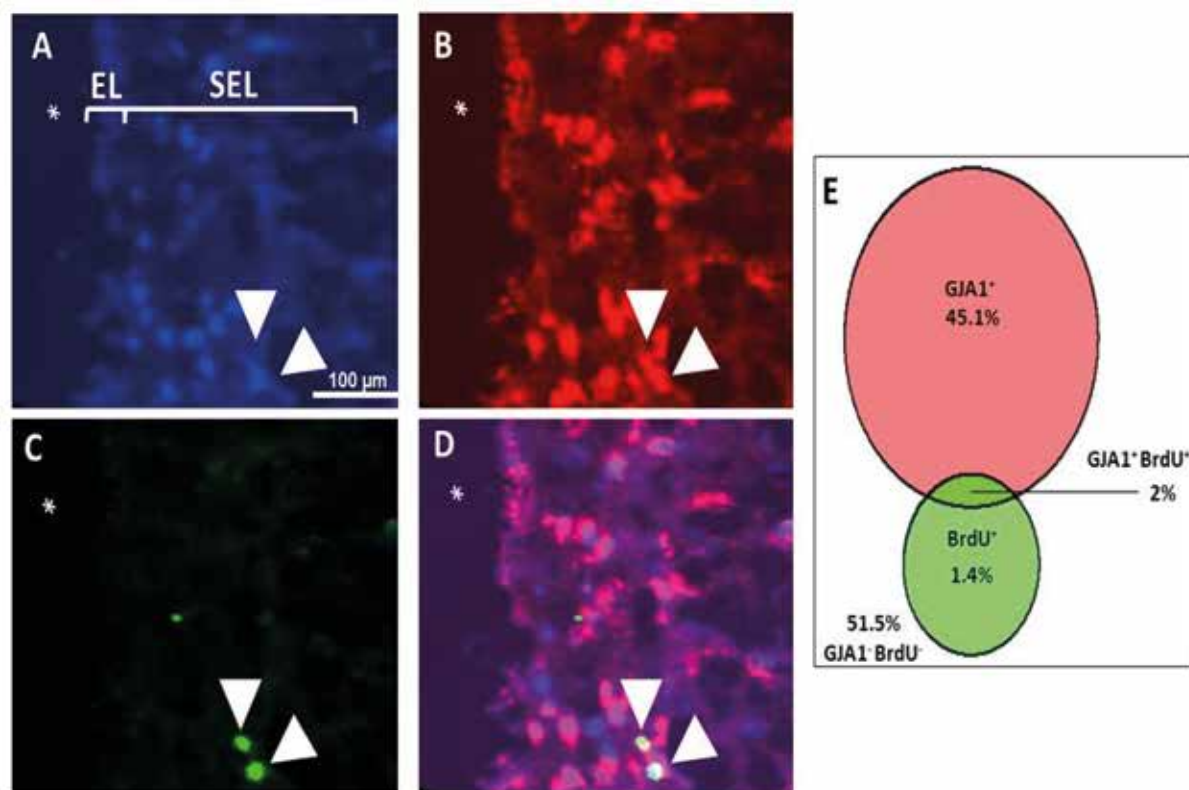
Двойнопозитивната субпопулация от $Vim^+/GJA1^+$ клетки представлява 7% от всички $DAPI^+$ (95% интервал на доверителност 4.77 – 8.99%), а двойнонегативната субпопулация $GFAP^-/TNC^-$ представлява 48.2% (95% интервал на доверителност 44.16 – 52.47%) (Фиг. 39). Допълнителен анализ на резултатите показва, че 16.4% от всички $GJA1^+$ клетки експресират Vimentin (95% интервал на доверителност 14.01 – 20.60%) и 42% от всички $GFAP^+$ клетки експресират $GJA1$ (95% интервал на доверителност 33.40 – 53.78%).



Фиг. 39: (A–D) Оцветяване за mRNA на $GJA1$ (B) (червено) в комбинация с Vimentin (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с $DAPI$ (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка $GJA1^+/Vim^+$. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: $GJA1^+$, Vim^+ , $GJA1^+/Vim^+$ и $GJA1^-/Vim^-$. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички $DAPI^+$ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

При оцветяване за BrdU нашите резултати показват, че 2% от всички клетки са двойнопозитивни за $GJA1$ и BrdU (95% интервал на доверителност 1.38 – 2.94%) (Фиг. 40). Единично позитивните клетки за $GJA1$ са 45.1% (95% интервал на довери-

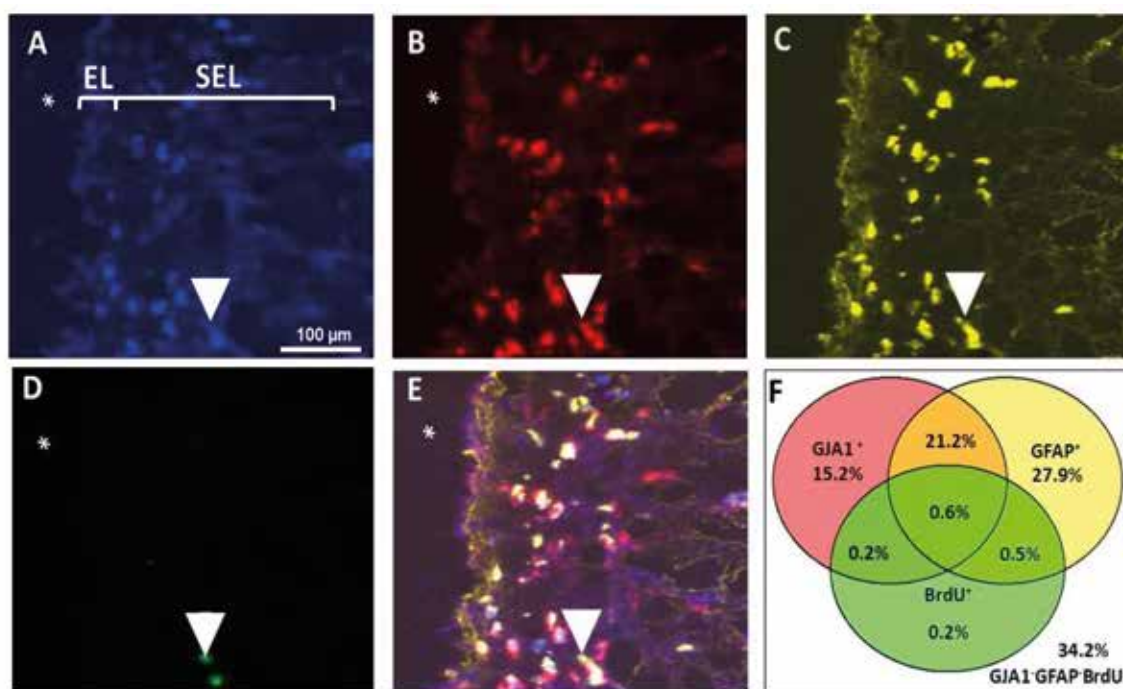
телност 43.73 – 49.36%), а тези за BrdU са 1.4% (95% интервал на доверителност 0.76 – 2.09%). Само 4% от всички BrdU⁺ клетки са позитивни за GJA1 (95% интервал на доверителност 2.46 – 5.72), докато 57.6% от всички GJA1⁺ са позитивни за BrdU (95% интервал на доверителност 43.33 – 73.52%).



Фиг. 40: (A–D) Оцветяване за mRNA на GJA1 (B) (червено) в комбинация с BrdU (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глави на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки GJA1⁺/BrdU⁺.

(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GJA1⁺, BrdU⁺, GJA1⁺/BrdU⁺ и GJA1⁻/BrdU⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

При тройна комбинация за BrdU, GFAP и GJA1 нашите резултати показват, че 0.6% от всички клетки са тройнопозитивни за GJA1, GFAP и BrdU (Фиг. 41). Единично позитивните клетки за GJA1 са 15.2%, за BrdU и GFAP съответно 0.2% и 27.9%.



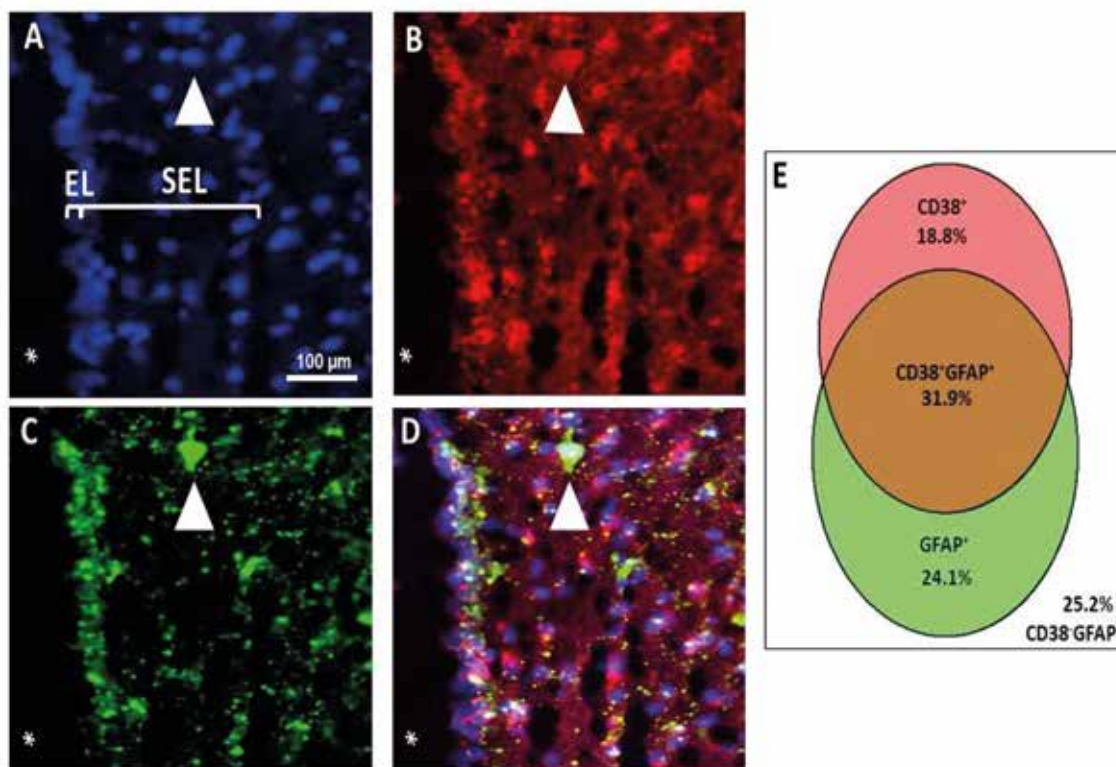
Фиг. 41: (А–Е) Оцветяване за mRNA на GJA1 (В) (червено) в комбинация с GFAP (С) (жълто) и BrdU (D) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани тройнопозитивни клетки GJA1⁺/BrdU⁺/GFAP⁺. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GJA1⁺, BrdU⁺, GJA1⁺/GFAP⁺, GFAP⁺/GJA1⁺, GJA1⁺/BrdU⁺ и GJA1⁻/BrdU⁻/GFAP⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки. С * е отбелязан вентрикуларният лумен.

6.16.4. Фенотипен анализ на CD38

Беше направено имунохистохимично оцветяване за GFAP, Vimentin и BrdU в комбинация с FISH за CD38. Оцветяванията ни показаха наличие на CD38⁺/GFAP⁺, CD38⁺/Vimentin⁺ и CD38⁺/BrdU⁺ клетки. Процентното съдържание на двойнопозитивните клетки беше съответно 31.9%, 11.9% и 1.3%.

От двойните оцветявания с GFAP и CD38 установихме, че единично позитивните за CD38 клетки представляват 24.1% от всички DAPI⁺ клетки, докато единично позитивните за GFAP клетки представляват 18.8% от всички DAPI⁺. Двойнопозитивната субпопулация от GFAP⁺/CD38⁺ клетки представлява 31.9% от всички DAPI⁺, а двойнонегативната субпопулация GFAP⁻/TNC⁻ представлява 25.2% (Фиг. 42). В допълнение, резултатите показват, че 62.8% от всички CD38⁺ клетки са двойнопози-

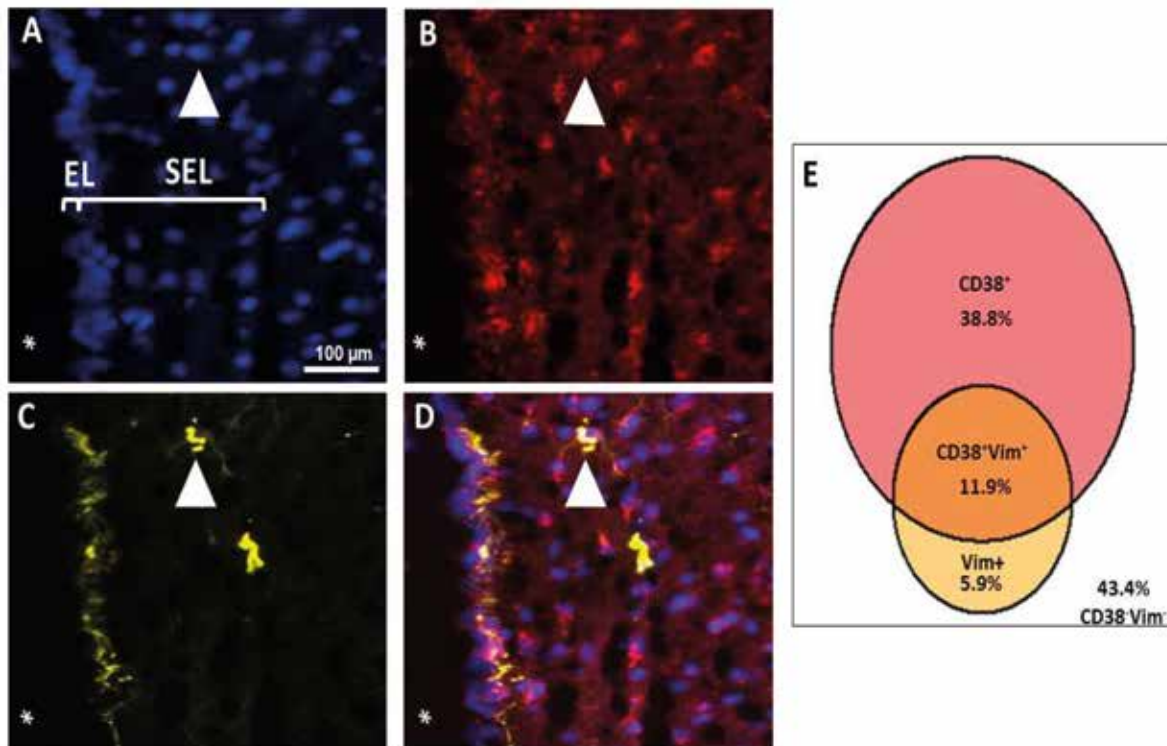
тивни за GFAP (95% интервал на доверителност 53.88 – 72.01%) и 56.9% от всички GFAP⁺ клетки са позитивни за CD38.



Фиг. 42: (A–D) Оцветяване за mRNA на CD38 (B) (червено) в комбинация с GFAP (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки CD38⁺/GFAP⁺.

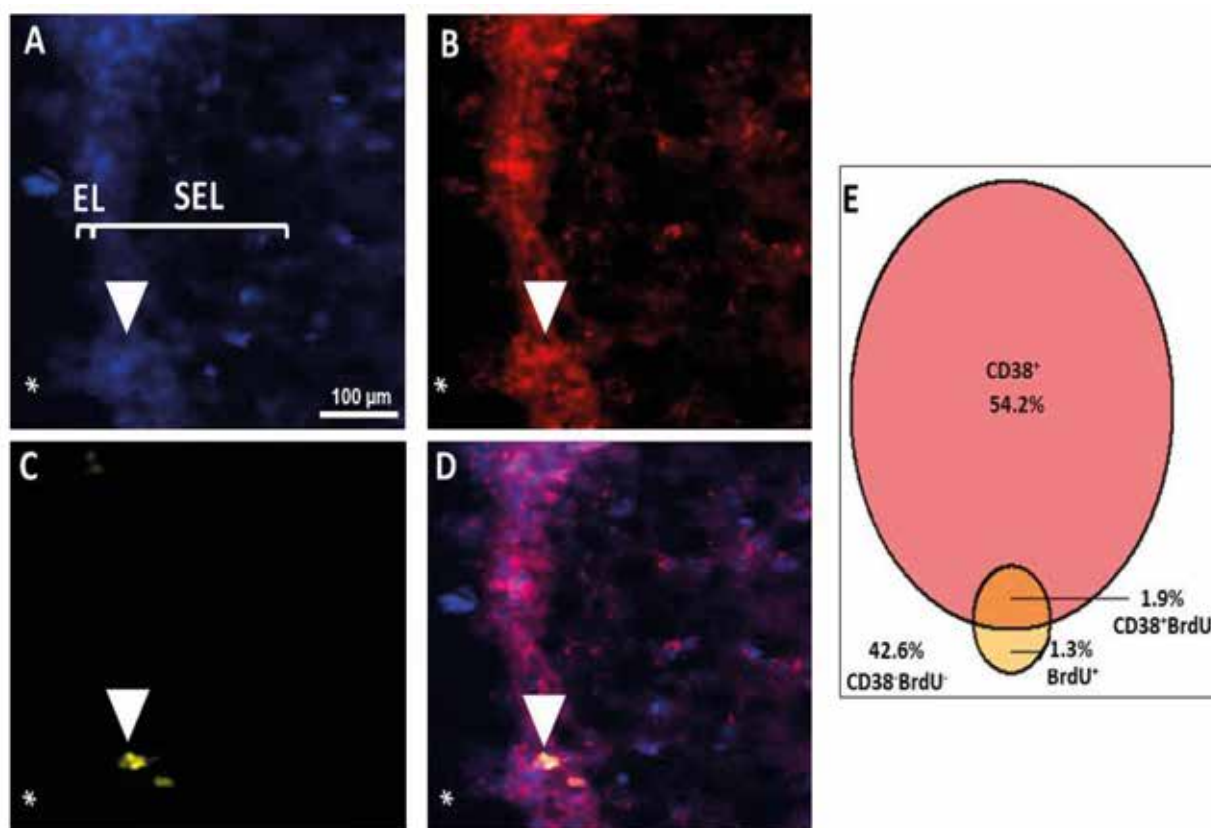
(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GFAP⁺, CD38⁺, GFAP⁺/CD38⁺ и GFAP⁻/CD38⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

При оцветяване за Vimentin установихме, че единично позитивните за CD38 клетки представляват 38.8% от всички DAPI⁺, а за Vimentin – 5.9% (Фиг. 43). Двойнопозитивната субпопулация от Vimentin⁺/CD38⁺ клетки представлява 11.9% от всички DAPI⁺. Негативната субпопулация на Vim⁻/CD38⁻ представлява 43.4%. Също така 23.5% от CD38⁺ клетки са двойнопозитивни за Vimentin, докато 67.5% от Vimentin⁺ клетки са позитивни за CD38.



Фиг. 43: (A–D) Оцветяване за mRNA на CD38 (B) (червено) в комбинация с Vimentin (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка CD38⁺/Vim⁺. (E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: Vimentin⁺, CD38⁺, Vimentin⁺/CD38⁺ и Vimentin⁻/CD38⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

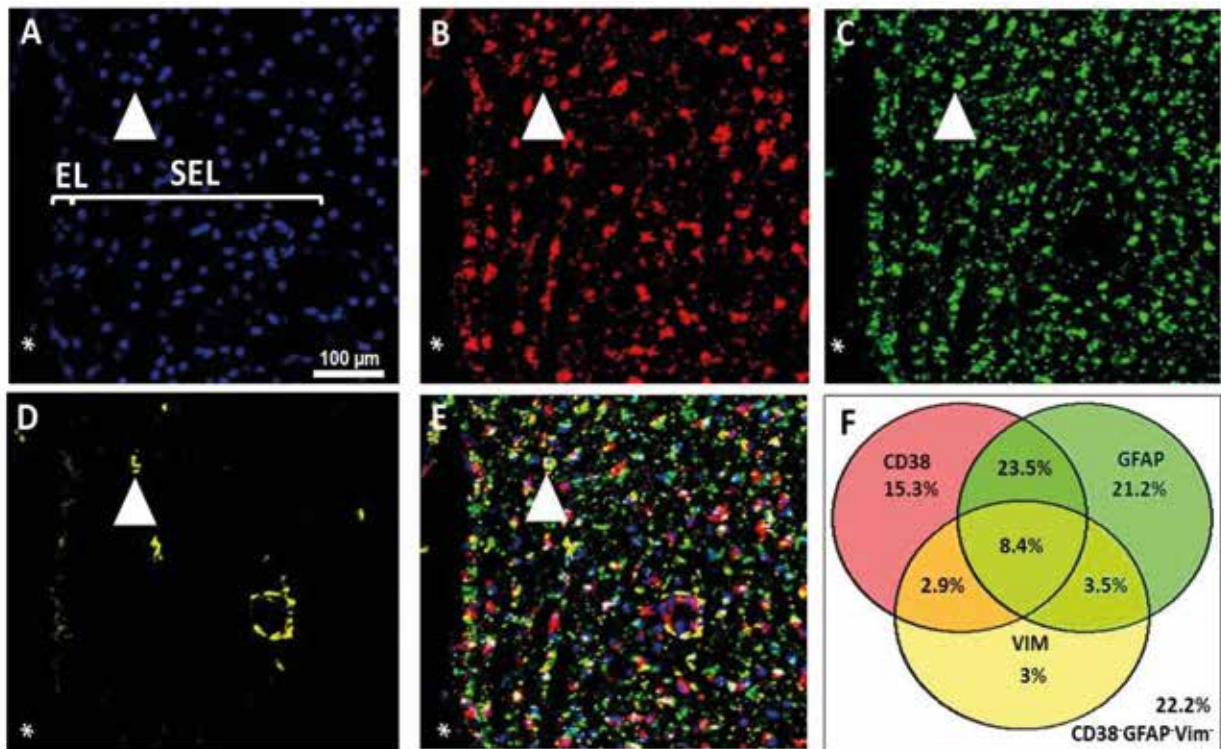
Оцветяването за BrdU и FISH за CD38 даде следните резултати: единично позитивните за CD38 клетки представляват 54.2% от всички DAPI⁺ клетки, докато делът на единично позитивните за BrdU клетки е 1.3% от всички DAPI⁺. Двойнопозитивната субпопулация от BrdU⁺CD38⁺ клетки представлява 1.9% от всички DAPI⁺, а двойнонегативната субпопулация BrdU⁻/CD38⁻ представлява 42.6% (Фиг. 44). Само 3.4% от всички CD38⁺ клетки са позитивни и за BrdU, докато 60% от всички BrdU⁺ клетки са позитивни за CD38.



Фиг. 44: (A–D) Оцветяване за mRNA на CD38 (B) (червено) в комбинация с BrdU (C) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки CD38⁺/BrdU⁺.

(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: BrdU⁺, CD38⁺, BrdU⁺/CD38⁺ и BrdU⁻/CD38⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

При тройна комбинация за VIM, GFAP и CD38 нашите резултати показват, че 8.4% от всички клетки са тройнопозитивни за посочените маркери (Фиг. 45) Единично позитивните клетки за CD38 са 15.4%, за VIM са 3%, а тези за GFAP – 21.2%.

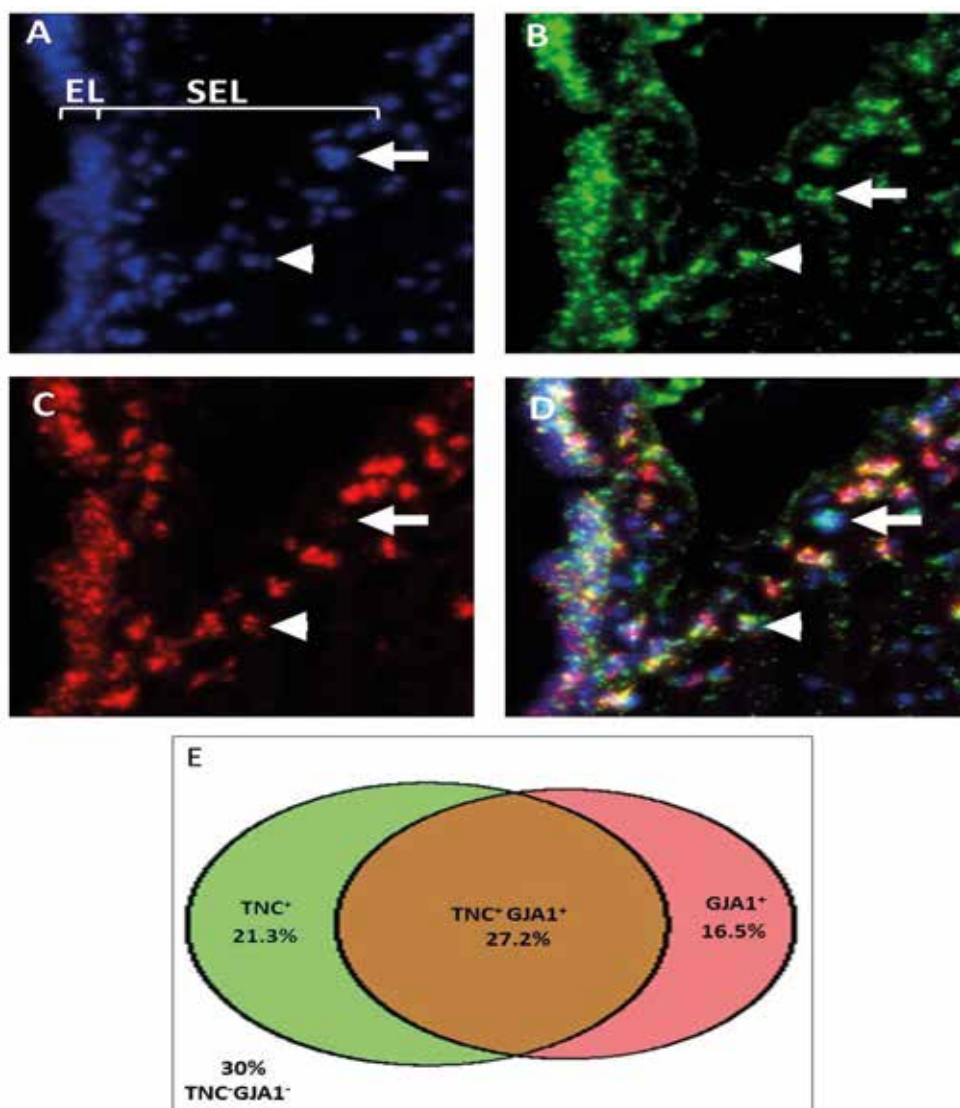


Фиг. 45: (A–E) Оцветяване за mRNA на CD38 (B) (червено) в комбинация с GFAP (C) (зелено) и VIM (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка CD38⁺/GFAP⁺/VIM⁺.

(F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: GFAP⁺, CD38⁺, VIM⁺, GFAP⁺/CD38⁺, VIM⁺/CD38⁺, GFAP⁺/VIM⁺/CD38⁺, GFAP⁺/VIM⁺, GFAP⁻/VIM⁻/CD38⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

6.16.5. Коекспресия между някои от избраните гени

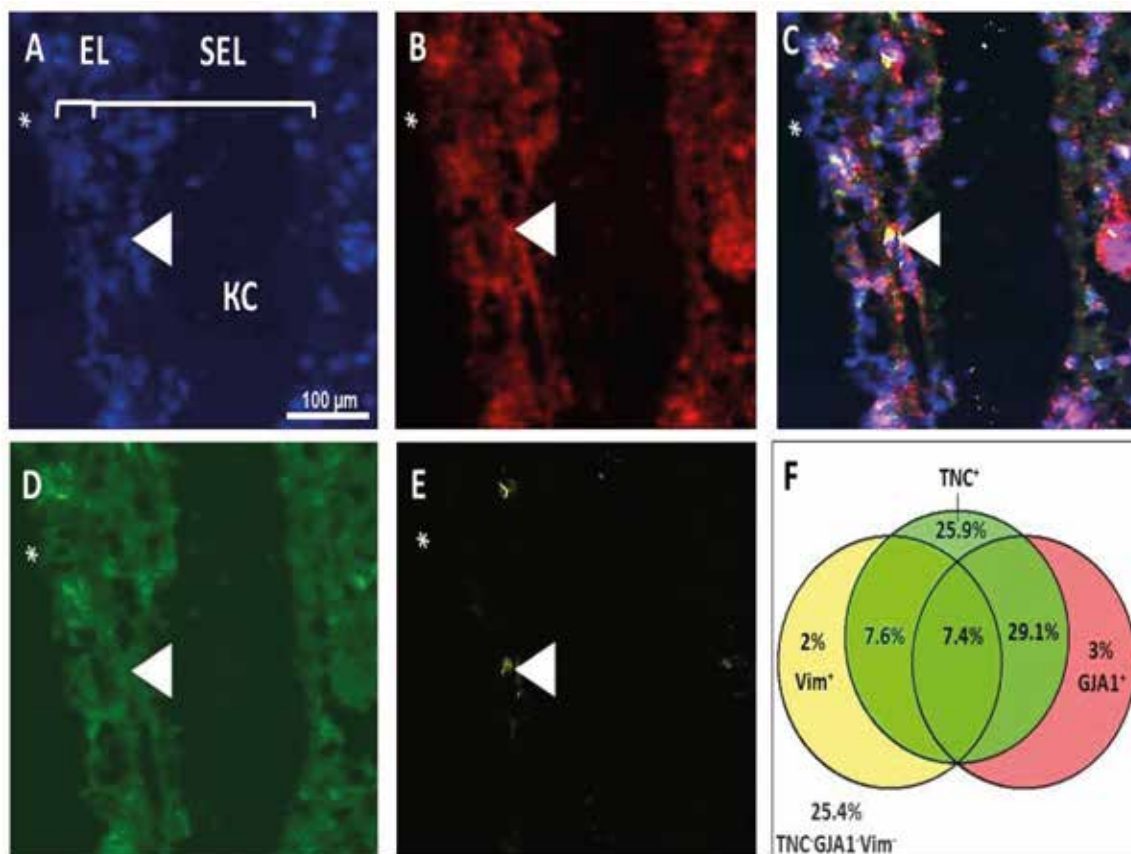
Тъй като TNC и GJA1 представляват субпопулация от qNSCs или aNSCs, ние използвахме двойно FISH оцветяване за двата гена и установихме, че 36.5% от всички клетки са двойнопозитивни за двата гена, докато 33.4% и 2.9% са единично позитивни съответно за TNC и GJA1 (Фиг. 46). За да проучим фенотипа на откритата субпопулация от клетки, направихме двоен FISH в комбинация с имунохистохимично оцветяване на BrdU и Vimentin.



Фиг. 46: (A–D) Оцветяване за mRNA на TNC (B) (зелено) в комбинация с GJA1 (C) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана TNC⁺ клетка, която е негативна за GJA1. Със стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка GJA1⁺/TNC⁺.

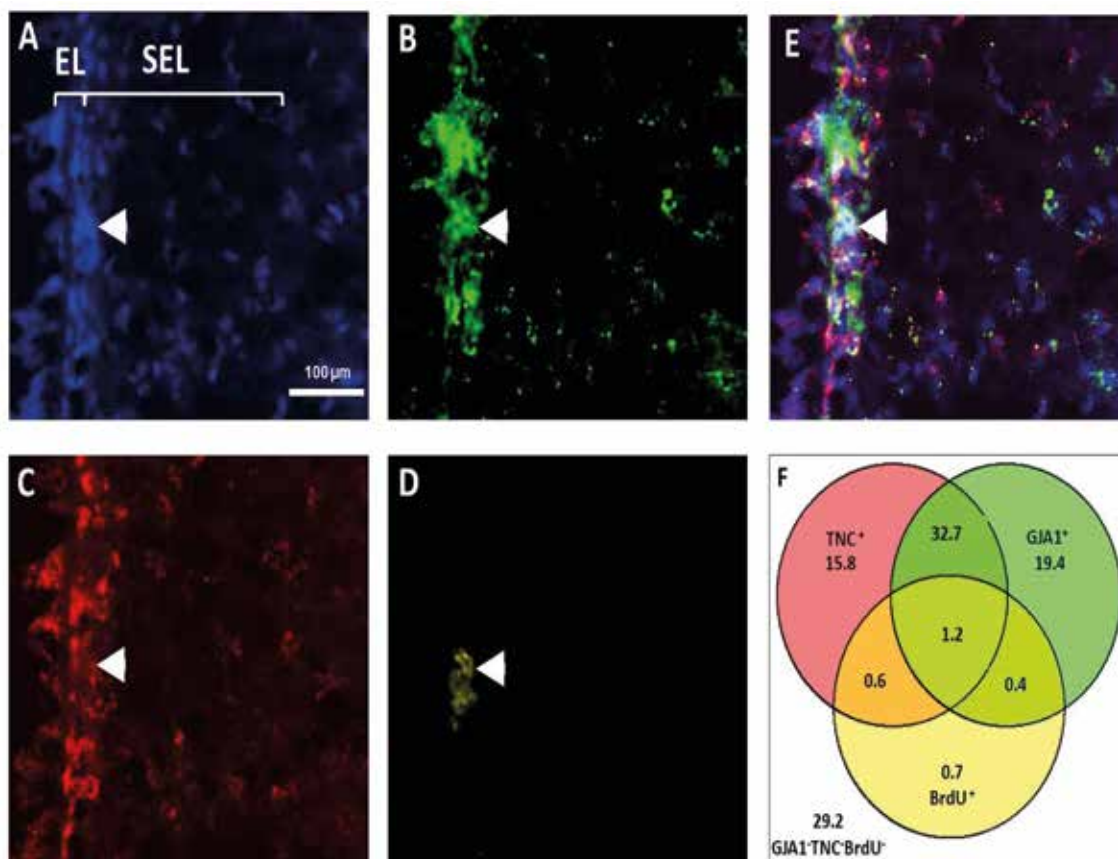
(E) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: TNC⁺, GJA1⁺, TNC⁺/GJA1⁺ и TNC⁻/GJA1⁻. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички DAPI⁺ клетки.

След преброяването установихме, че тройнопозитивната субпопулация от $TNC^+/VIM^+/GJA1^+$ клетки представлява 7.2%, докато делът на двойнопозитивните за TNC^+/VIM^+ клетки е 7.9% (Фиг. 47). Интересно е, че открихме наличието на субпопулация от $TNC^-/GJA1^+/VIM^+$, а субпопулацията $TNC^-/GJA1^+$ не експресира Vimentin.



Фиг. 47: (А–Е) Оцветяване за mRNA на TNC (D) (зелено) в комбинация с GJA1 (B) (червено) и Vimentin (E) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). Със стрелка е отбелязана тройнопозитивна клетка $GJA1^+/TNC^+/VIM^+$. (C) Показва компилация от (A), (B), (C) и (D). С глава на стрелка е отбелязана единично позитивна клетка $GJA1^+/TNC^-/VIM^-$. (F) Venn диаграма, изобразяваща различните клетъчни субпопулации: TNC^+ , $GJA1^+$, TNC^+GJA1^+ и $TNC^-/GJA1^-/VIM^-$, VIM^+/TNC^+ и $VIM^+/GJA1^+$. Процентите отразяват дела на съответната фракция от всички $DAPI^+$ клетки.

Допълнително направихме и флуоресцентно имунохистохимично оцветяване на комбинацията TNC и GJA1 с BrdU (Фиг. 48). От получените резултати установихме, че субпопулацията TNC⁻/GJA1⁺ не само не експресира Vim, но и не включва клетки, инкорпорирали BrdU в ядрото си.



Фиг. 48: (А–Е) Оцветяване за mRNA на GJA1 (В) (зелено) в комбинация с TNC (С) (червено) и BrdU (D) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо).

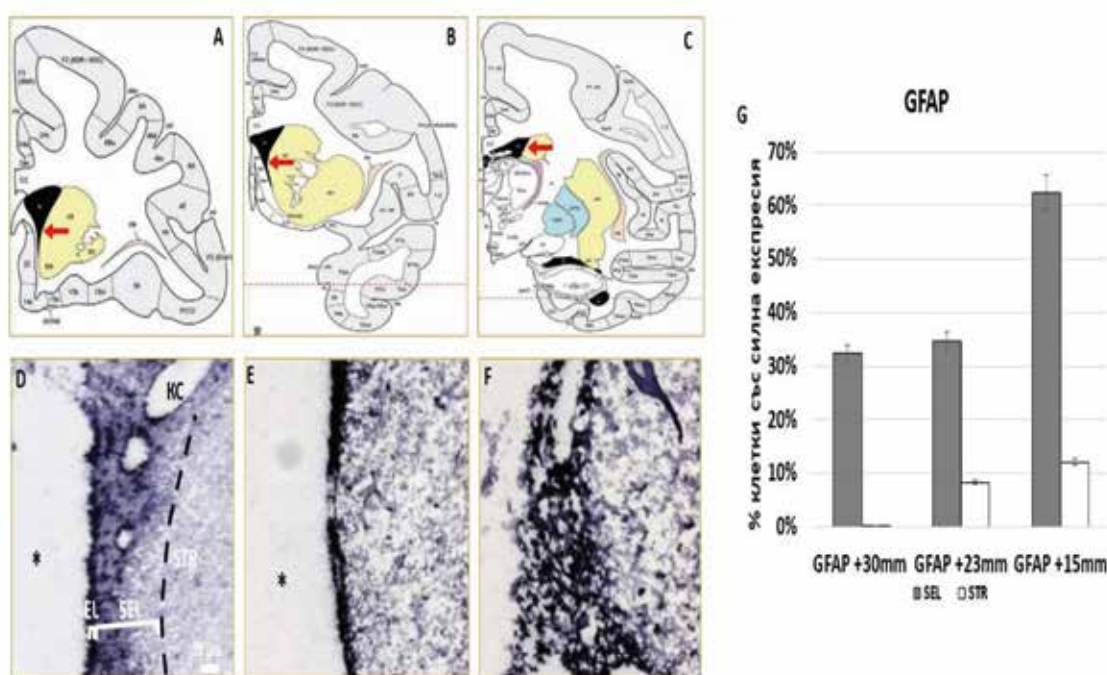
С глава на стрелка е отбелязана група от двойнопозитивни клетки за GJA1⁺/BrdU⁺, които са негативни за TNC.

(F) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: TNC⁺, GJA1⁺, TNC⁺/GJA1⁺ и TNC⁻/GJA1⁻BrdU⁻, BrdU⁺/TNC⁺ и BrdU⁺/GJA1⁺ от всички клетки.

6.17. Изясняване на различията в експресията на GFAP и Vimentin

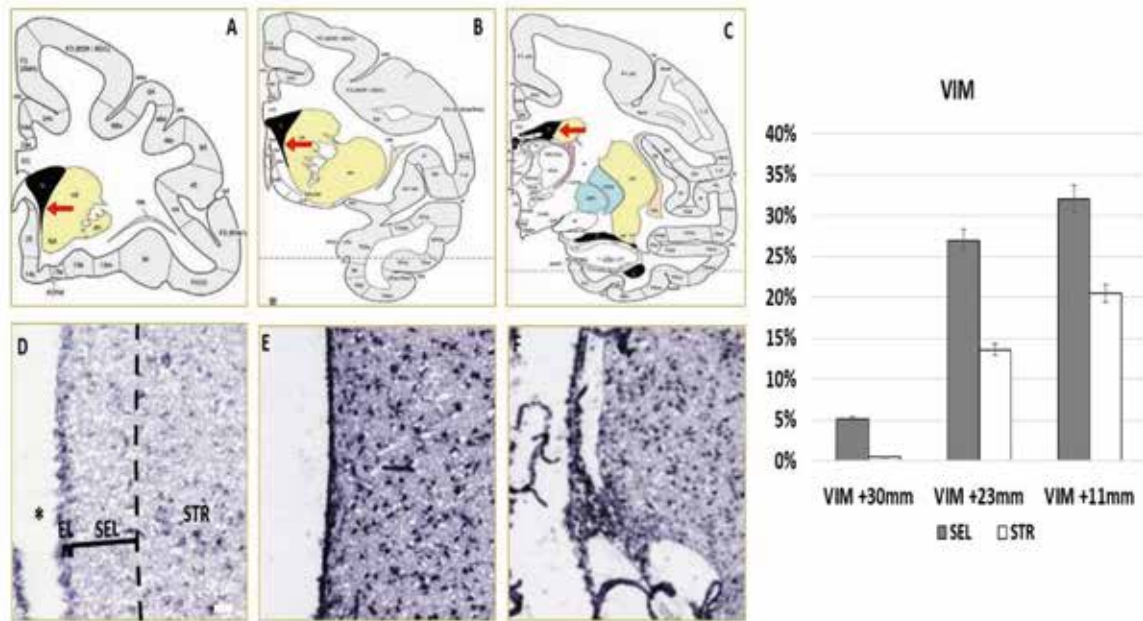
Чрез направената имунохистохимична характеристика на избраните гени с GFAP и Vim забелязахме различия в процентното съдържание на двата маркера при различните оцветявания (виж Фиг. 28, 29, 32, 33 и др.). При имунохистохимичното оц-

ветяване за GFAP в комбинация с *in situ* хибридизация за TNC бяха установени 34.8% позитивни за GFAP клетки от всички DAPI⁺ клетки. В сравнение при имунохистохимичното оцветяване за GFAP в комбинация с *in situ* хибридизация за APLNR беше установено, че GFAP⁺ клетки представляват 73.1% от всички DAPI. За да разберем откъде идват разликите в процентните съдържания на двата маркера, бяха направени *in situ* хибридизационни оцветявания за GFAP и Vim по ростро-каудалната ос. *In situ* хибридизацията беше предпочетена пред имунохистохимията поради по-лесното от-диференциране на позитивните клетки и съответно тяхното броене поради наличието на вече установен метод за количествено определяне на генната експресия.



Фиг. 49: Експресия на GFAP по рострално-каудалната ос в маймунски мозък: (A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm, по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²². (D–F) *In situ* хибридизация за APLNR в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm. (G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на GFAP в SEL и striatum на трите нива.

Резултатите ни показват, че процентното съдържание на GFAP е различно на различните ростро-каудални нива (Фиг. 49) и в границите, наблюдавани при имунохистохимичните оцветявания. Оцветяването за VIM показва идентични резултати и отново потвърждава различните проценти, наблюдавани при фенотипизирането на различните гени (Фиг. 50).



Фиг. 50: Експресия на VIM по рострално-каудалната ос в маймунски мозък:

(A–C) Координати на избраните от нас нива, съответстващи на (A) +30 mm, (B) +23 mm, (C) +15 mm, по „A Combined MRI And Histology Atlas Of The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates”¹²².

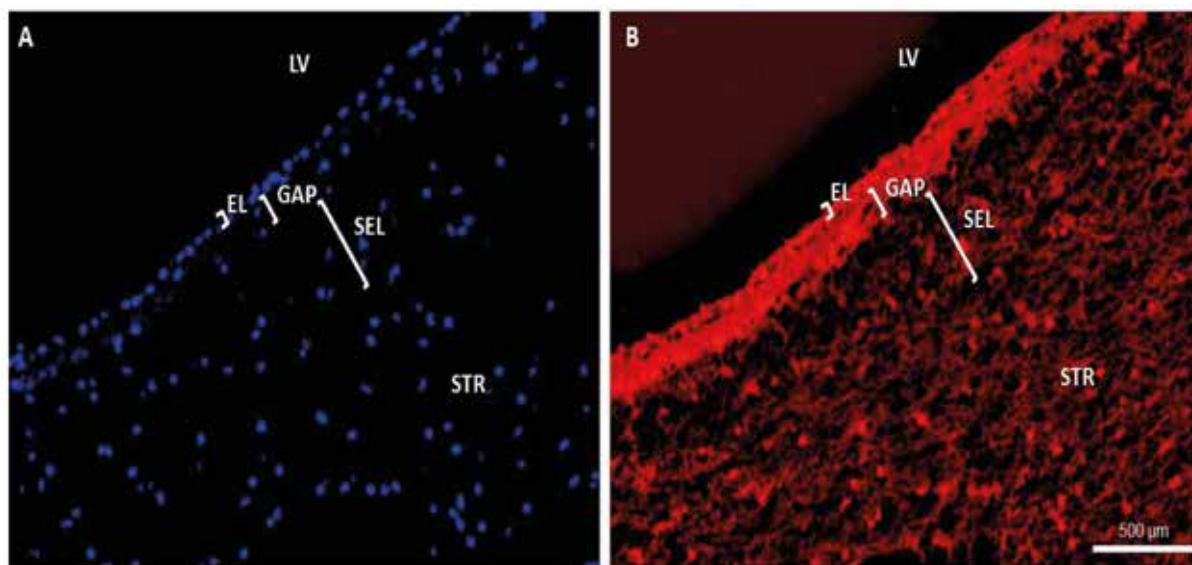
(D–F) In situ хибридизация за VIM в коронарни срези от мозък на възрастен макак: (D) +30 mm, (E) +23 mm, (F) +15 mm.

(G) Сравнение на относителния дял на клетките със силна експресия на VIM в SEL и striatum на трите нива.

6.18. Фенотип на APLNR позитивни клетки в SVZ

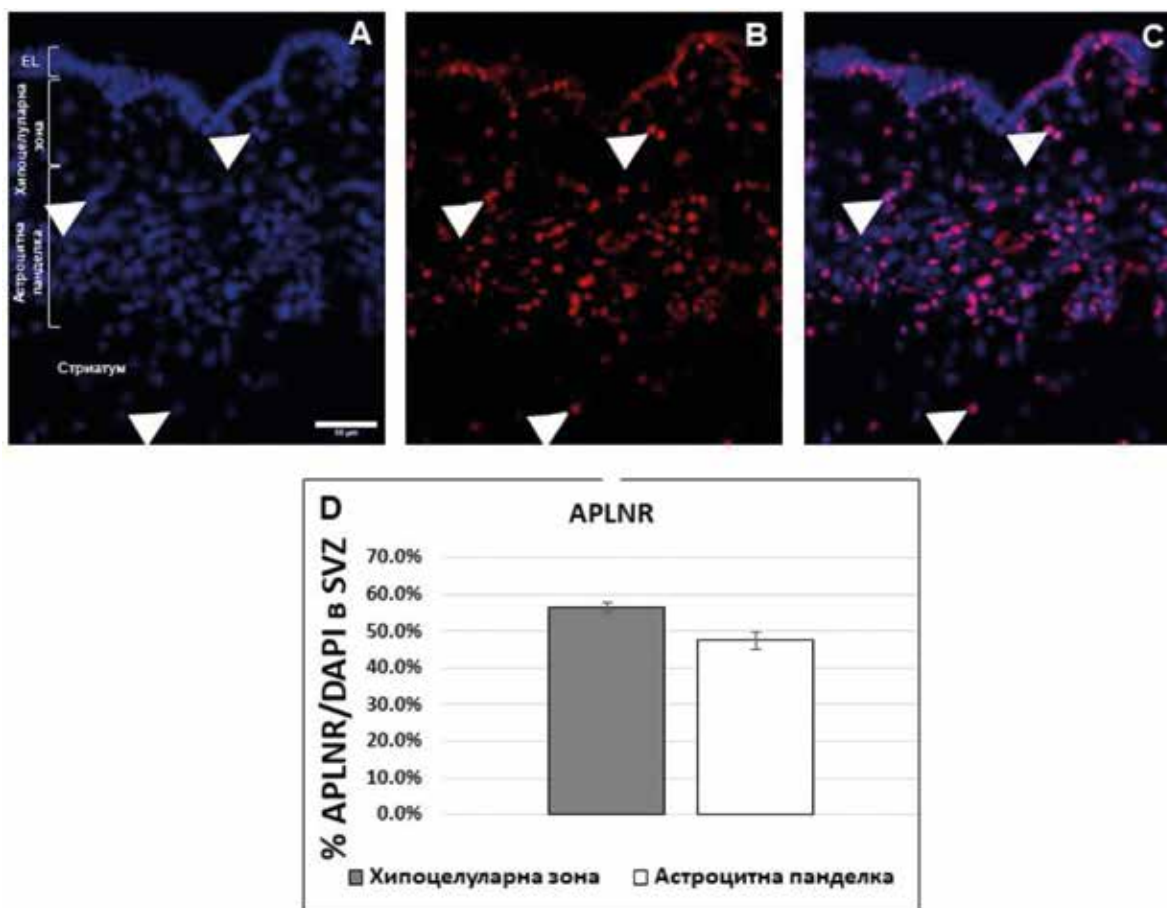
от нормален човешки мозък

Високата експресия на APLNR в маймунския мозък, наличието на литературни данни за участието на апелинергичната система в нормални физиологични и патофизиологични процеси, както и фактът, че APLNR може да бъде използван като фармакологична мишена, ни мотивираха да задълбочим нашите изследвания върху експресията на APLNR в субвентрикуларната зона на нормален човешки мозък. За да разберем дали APLNR се експресира в тази зона, използвахме имунохистохимични методи, за да оцветим човешки мозъчни материали с пост-мортем интервал <24 часа (Фиг. 51). Нашите резултати демонстрираха наличието на протеина в зоната на интерес. Човешката субвентрикуларна зона е изградена от три слоя: епендимен, гап зона и субепендимен слой, съдържащ астроцитна панделка (от англ. Astrocytic ribbon). Експресия на APLNR се наблюдава и в трите слоя на зоната.



Фиг. 51: (А–В) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). Прави впечатление силната експресия на APLNR в зоната на интерес.

Нашият статистически анализ показва, че в хипоцелуларната зона положителните клетки за APLNR са 56% (95% интервал на доверителност 55.63 – 57.12%) в сравнение с астроцитната панделка, където те са около 47% (95% интервал на доверителност 46.95 – 47.88%) от всички клетки, маркирани с DAPI (Фиг. 52).



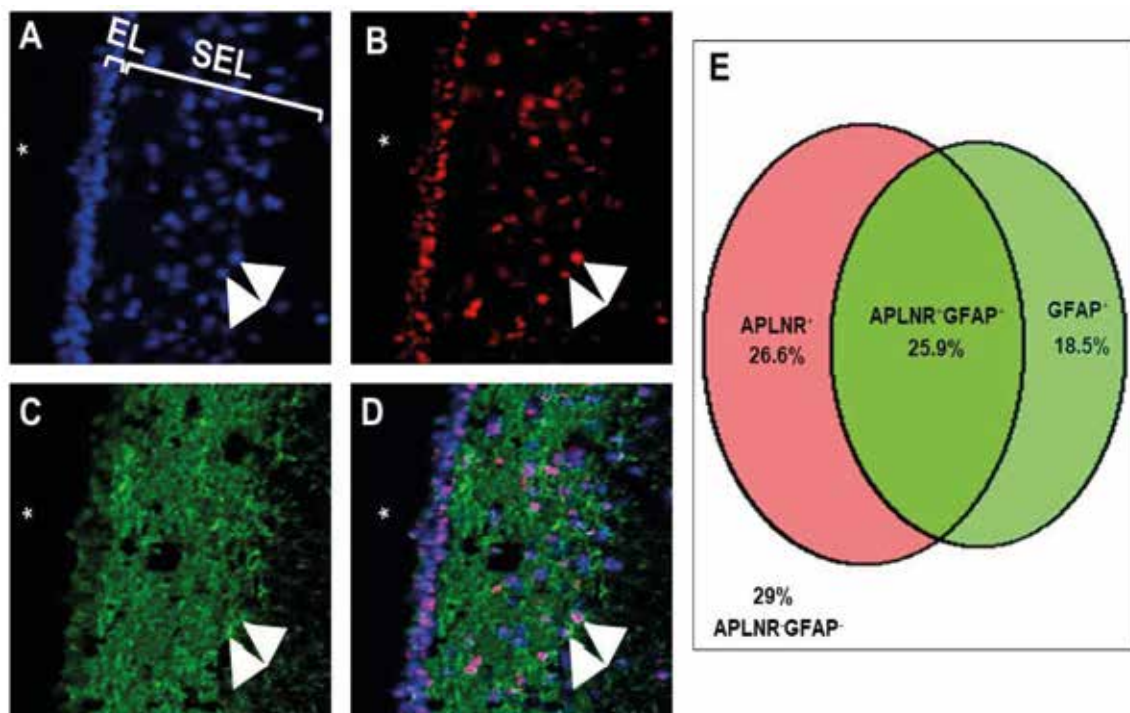
Фиг. 52: (А–С) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). (D) Процентно съдържание на APLNR в хипоцелуларната зона и астроцитната панделка на SVZ.

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

От резултатите, получени при двойното флуоресцентно имунохистохимично оцветяване с APLNR и GFAP, открихме, че APLNR се експресира в GFAP⁺ клетки и техните израстъци в астроцитната панделка (от англ. Astrocytic ribbon) (Фиг. 53). Установихме, че APLNR се експресира в GFAP⁺ клетки в SVZ. Двойното оцветяване с APLNR и GFAP, маркер за NSCs, както и за астроцити, показва, че от всички APLNR⁺ клетки в астроцитната лента средно 55% от тях са GFAP⁺ (95% интервал на доверителност 43.68 – 55.03%).

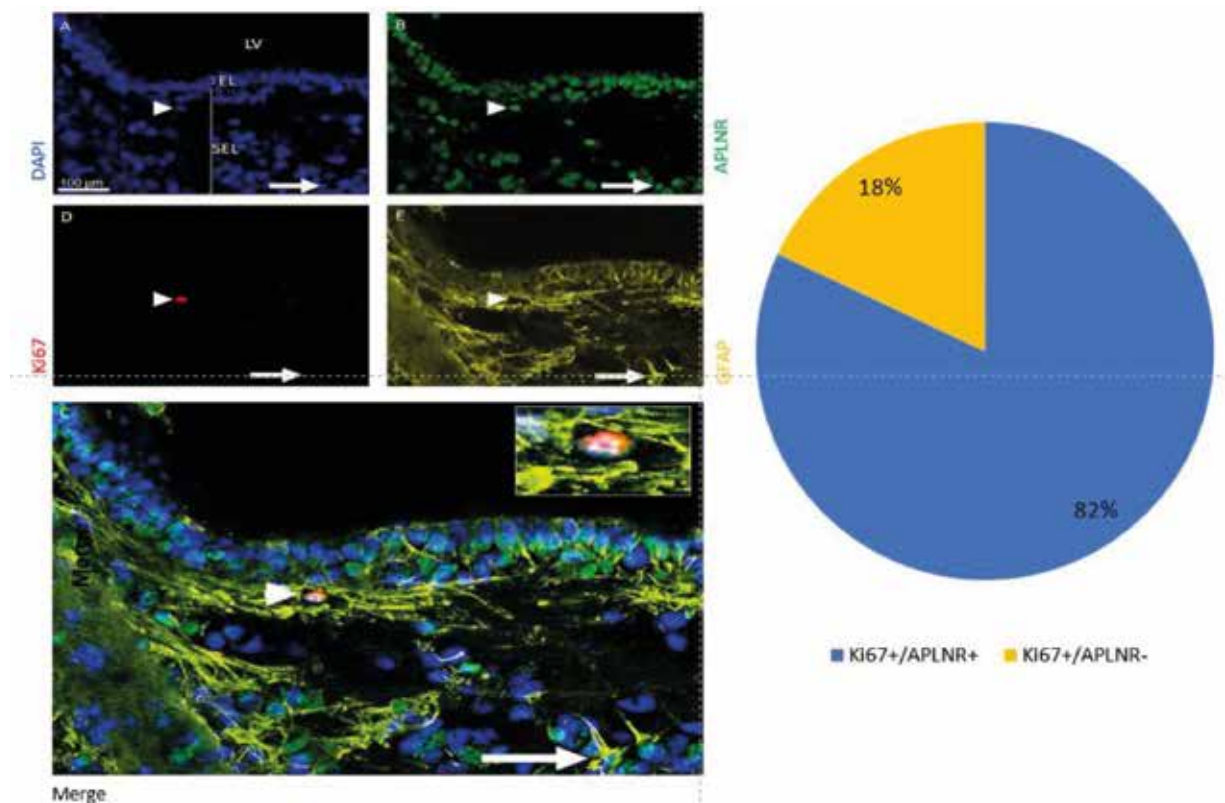
Ако сравним този процент между 3-те дорзо-вентрални области, можем да видим, че във вентралната SVZ съотношението на двойноположителните клетки спря-

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



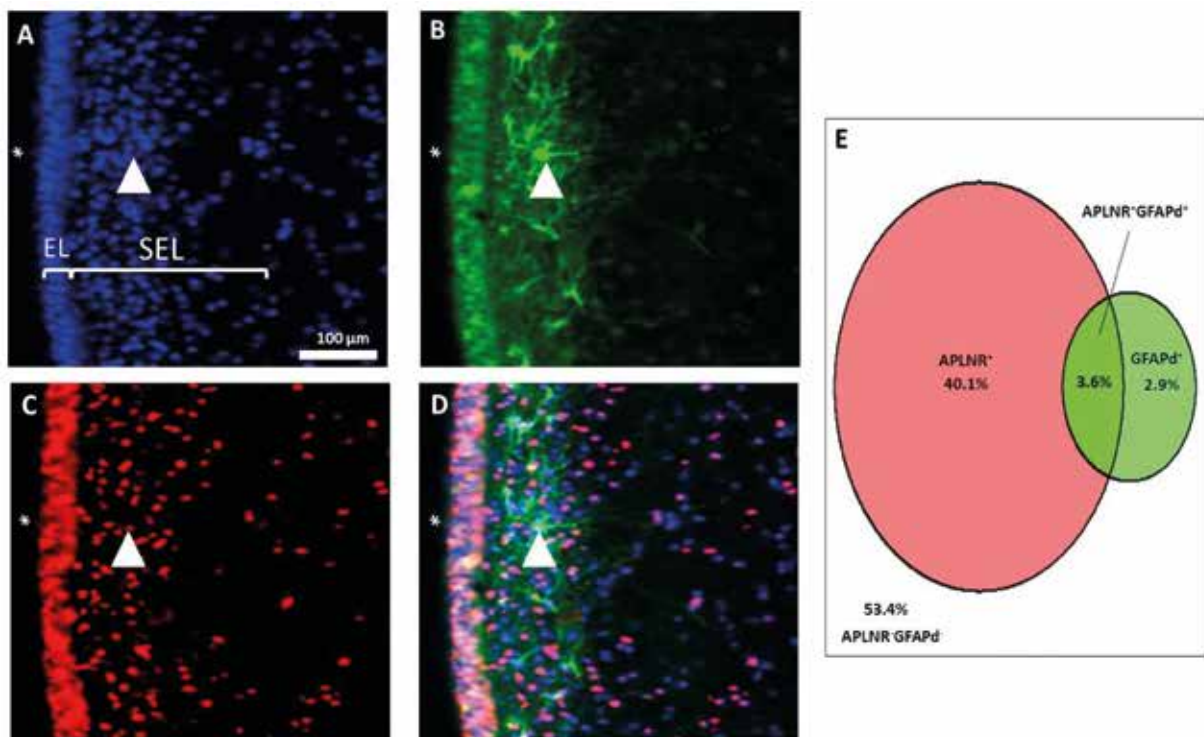
Фиг. 53: (А–С) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено) и GFAP (С) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (синьо) (А). Забелязват се двойнопозитивни клетки за APLNR и GFAP, отбелязани с глава на стрелка в SEL. (Е) Процентно съотношение на отделните клетъчни субпопулации: APLNR⁺, GFAP⁺, APLNR⁺/GFAP⁺ и APLNR⁻/GFAP⁻ от всички клетки.

Ki67 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) е пролиферативен маркер, който бележи делящите се клетки. За да установим количеството на делящите се клетки в SVZ на човек и дали APLNR⁺ субпопулация пролиферира, използвахме тройно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване с антитела срещу APLNR, GFAP и Ki67 на човешки мозък в норма. Забелязахме, че Ki67⁺ клетки по цялата дължина на вентрикула са малко (17 клетки от общо n = 3 преброени коронарни среза) (Фиг. 50). От тези 17 клетки 14 са позитивни и за APLNR или 82% позитивни за APLNR от всички делящи се клетки, 2 са позитивни и за APLNR, и GFAP, а една е негативна както за APLNR, така и за GFAP (Фиг. 54). Всички от тях се намират в слой II (gap zone) или слой III (astrocytic ribbon).



Фиг. 54: (А–Е) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (зелено), Ki67 (D) (червено) и GFAP (E) (жълто). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана единична двойнопозитивна клетка за APLNR и Ki67. Със стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и GFAP. Микрографията в горния ляв ъгъл на (C) показва увеличение на Ki67⁺ клетка.

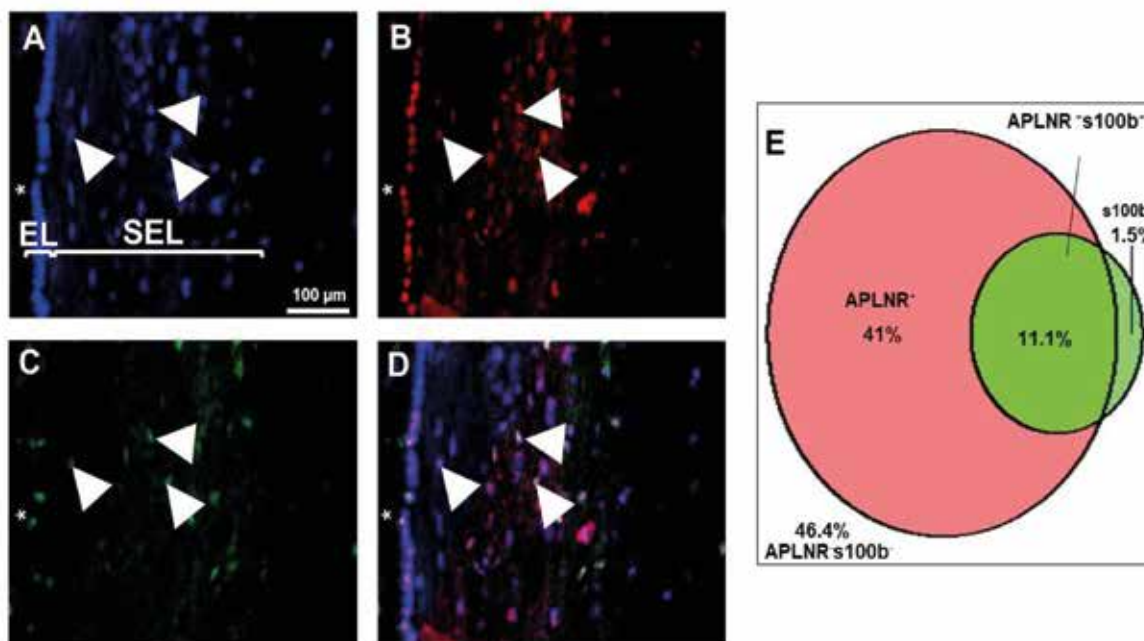
За да разберем дали APLNR се експресира в bona fide NSCs в субвентрикулярната зона при човека, ние направихме двойно имунохистохимично оцветяване за GFAP-delta и APLNR и открихме, че APLNR се експресира в GFAP-delta⁺ клетки и техните израстъци в астроцитната панделка (от англ. Astrocytic ribbon) (Фиг. 55).



Фиг. 55: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (C) (червено) и GFAP-delta (B) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и GFAP-delta.

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

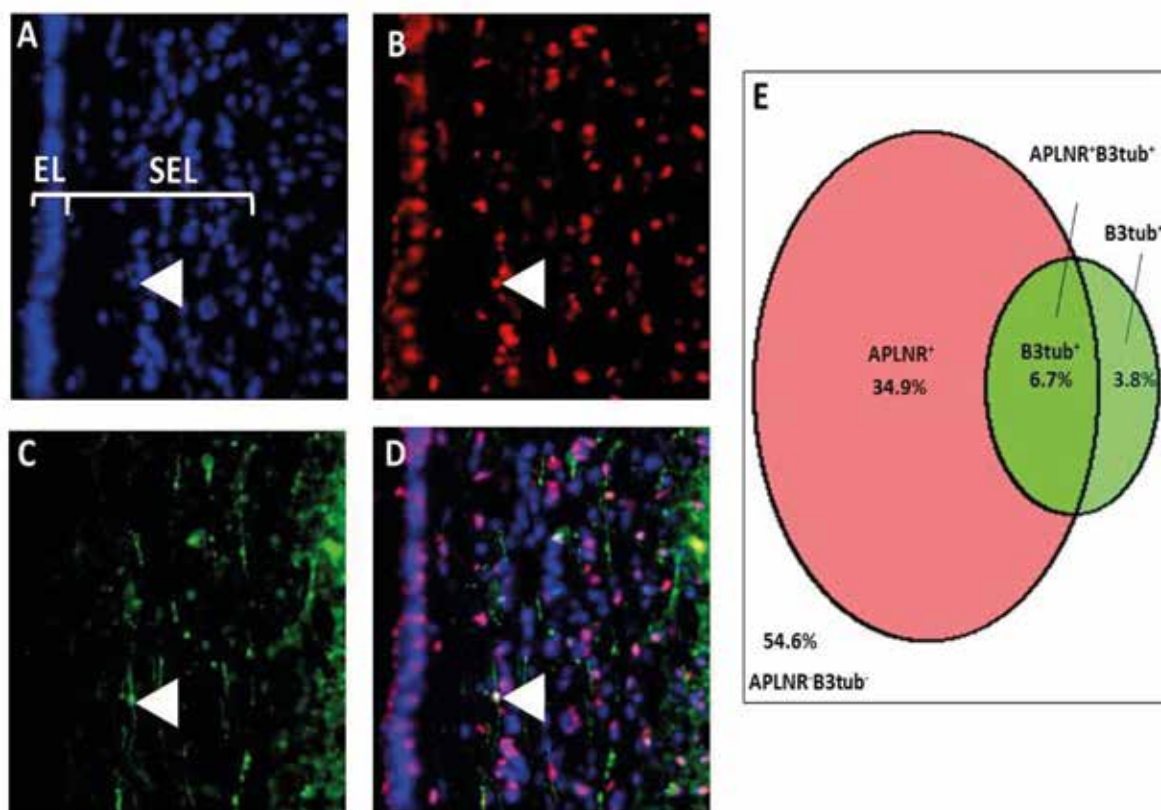
За да отдиференцираме невроналните стволови/прогениторни клетки от пост-митотичните паренхимни астроцити, използвахме калций-свързващия протеин s100b (Фиг. 56). Нашите резултати показват, че в хипоцелуларната зона 11% (95% интервал на доверителност 9.58 – 12.02%) от всички APLNR⁺ клетки са двойноположителни, представляващи изместени епендимни клетки в сравнение с астроцитната панделка, където почти 25% от тях са съвместно маркирани за този маркер, съответстващ на зрели астроцити (95% интервал на доверителност 18.41 – 25.98%).



Фиг. 56: (А–Е) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (В) (червено) и s100b (С) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (А) (синьо). (Е) С глави на стрелки са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и s100b.

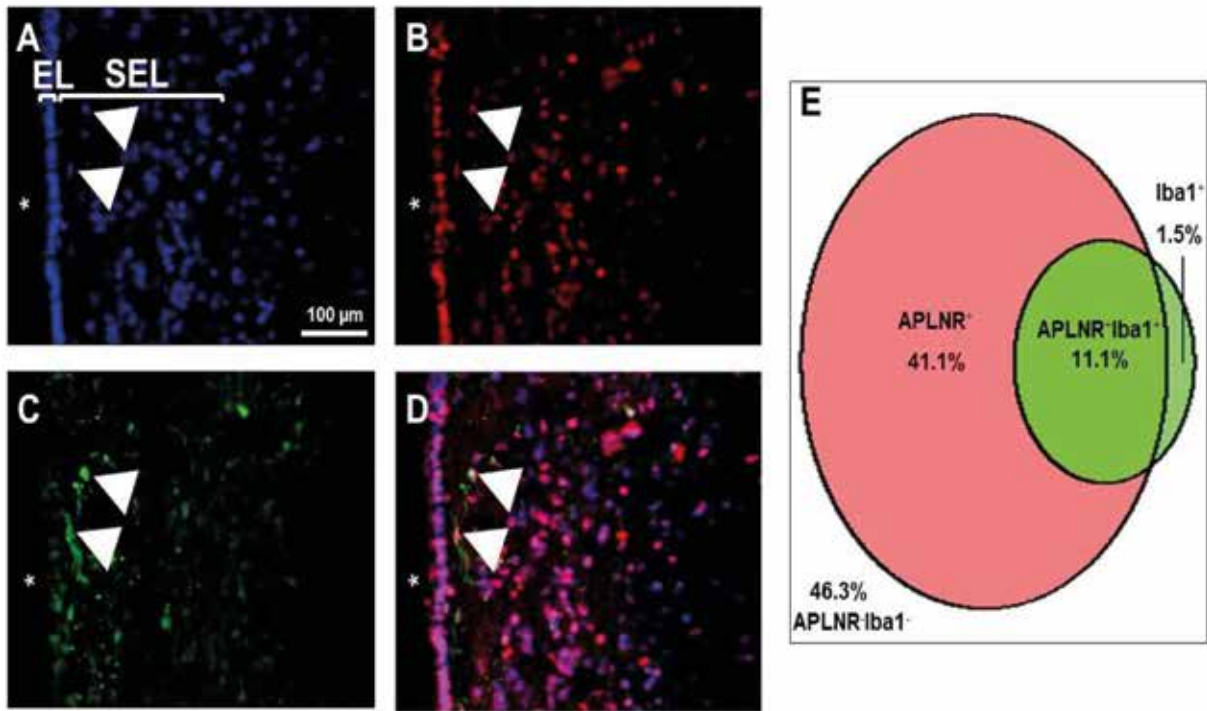
В своя етап на развитие невроналните стволови/прогениторни клетки започват да се диференцират, превръщайки се първоначално в амплификационни клетки – вид бързо делящи се клетки, които от своя страна се диференцират в незрели неврони или невробласти. Невробластите мигрират по RMS до ОБ, където се диференцират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

Двойни оцветявания бяха направени и с β -III-tubulin (Фиг. 57). Статистиката показва, че в хипоцелуларната зона има намаление в дела на двойноположителни клетки от всички APLNR+ клетки от дорзално към вентрално.



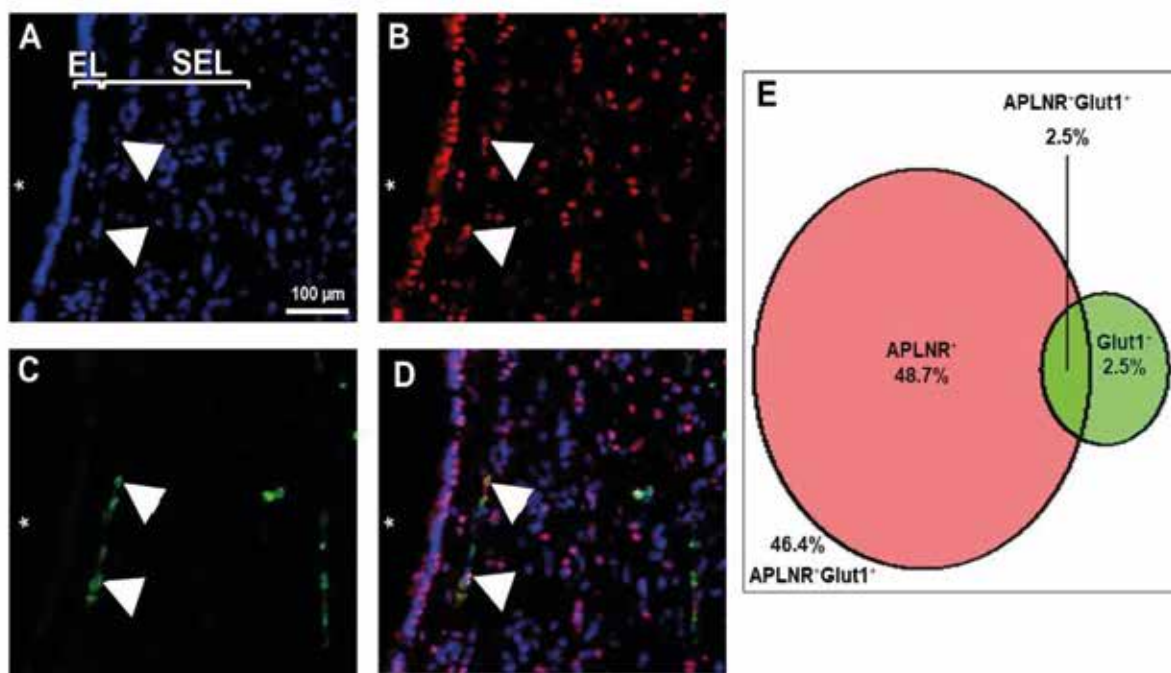
Фиг. 57: (A–D) Флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и β -III-tubulin (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLNR и β -III-tubulin в SEL (D).

За да разберем дали микроглиалните клетки, които са основните фагоцитиращи клетки в мозъка, експресират APLNR, направихме двойно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване Iba1 и APLNR (Фиг. 58). Нашите резултати показват, че от всички APLNR⁺ клетки 41% от тях в хипоцелуларната зона са двойноположителни за Iba1 (95% интервал на доверителност 40.35 – 42.54%), в сравнение с астроцитната панделка, където те са 12% (95% интервал на доверителност 11.41 – 13.76%).



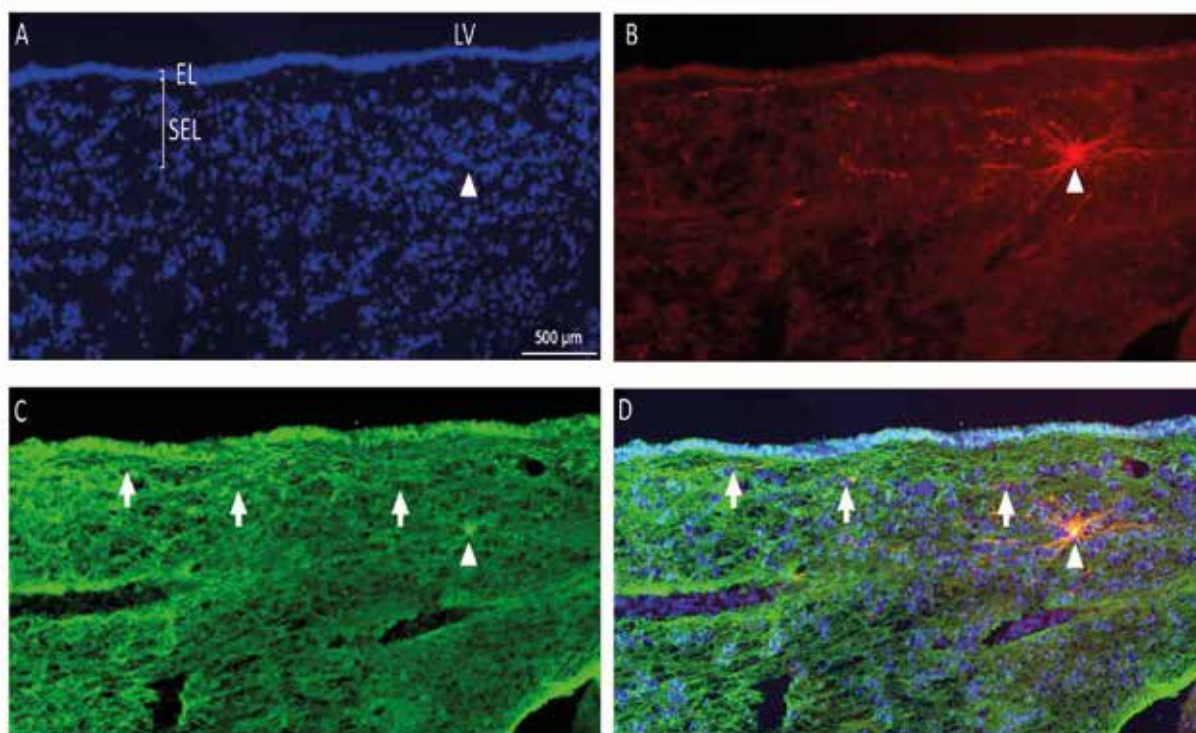
Фиг. 58: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и Iba1 (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и Iba1 в SEL.

За да разберем дали мозъчните ендотелни клетки експресират APLNR, направихме двойно флуоресцентно имунохистохимично оцветяване GLUT1 и APLNR (Фиг. 59). Резултатите ни показаха, че почти 5% от всички APLNR⁺ клетки са ендотелни клетки, положителни за GLUT1 както в гап зоната, така и в астроцитната панделка (95% интервал на доверителност 2.96 – 6.51%).



Фиг. 59: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLNR (B) (червено) и GLUT1 (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо). С глава на стрелка са отбелязани двойнопозитивни клетки за APLNR и GLUT1 в SEL.

Апелинергичната система се състои от апелиновия рецептор и лиганда апелин, който го активира. Въз основа на този факт ние искахме да разберем дали сигналът за активация на рецептора, т.е. лигандът апелин, идва от цереброспиналната течност, или има клетки в SVZ, които го секретират. За тази цел направихме флуоресцентно имунохистохимично оцветяване за APLN в комбинация с GFAP. Открихме единични клетки (≈ 1 клетка на коронарен срез, обхващащ целия вентрикул, която се намираше в SVZ и беше позитивна за GFAP). Също така забелязахме масивна арборизация на клетъчните израстъци, които или достигаха до кръвоносни съдове, или до някоя от зоните на SVZ (Фиг. 60).



Фиг. 60: (A–D) Имунохистохимично оцветяване за APLN (B) (червено) и GFAP (C) (зелено). Всички ядра са оцветени с DAPI (A) (синьо).

С глава на стрелка е отбелязана двойнопозитивна клетка за APLN и GFAP в SEL, докато със стрелки са отбелязани израстъците на клетката, достигащи до кръвоносни съдове и епендимата (D).

7. ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото изследване демонстрира за първи път наличието и усилването на генната експресия на APLNR, CD38, TNC и GJA1 в модел на исхемично увреждане при възрастна маймуна (виж Глави 6.1.1., 6.1.2., 6.1.3., 6.1.4.). Ние доказваме също, че тези гени се експресират в различни субпопулации от стволови/прогениторни клетки и че тяхната експресия варира в различна степен по ростро-каудалната ос при животни в норма (без исхемия). Не на последно място ние показваме, че APLNR се експресира в човешката субвентрикуларна зона, което дава възможност за последващи изследвания, свързани с терапевтичната апликация на лиганда апелин.

7.1. Индуциране на експресия на гени след глобална исхемия

Един от получените резултати показва завишена експресия на гени, експресирани в SVZ на възрастна маймуна след глобална исхемия (виж Глави 6.1.1., 6.1.2., 6.1.3., 6.1.4.). Нашето изследване се сведе до избор на гени, експресирани в различни части на SVZ, свързани или с локализацията на стволовите клетки в стволово-клетъчната ниша, или със сигнали, които те получават от нея (виж глава 6.1.). Степента на експресия беше потвърдена по два различни начина, което доказва правотата на резултатите. Нашите наблюдения показват, че клетките, съдържащи mRNA за TNC, APLNR, GJA1 и CD38, са многократно завишени в субвентрикуларния слой. При всички гени наблюдавахме и засилена експресия в клетки, разположени около кръвоносните съдове (Фиг. 14–17). Различни фактори, преминаващи или през кръвоносните съдове, или през епендимните клетки от цереброспиналната течност, могат да имат определено влияние върху стволовите или прогениторните клетки в SVZ.

7.2. Експресия на гените TNC, APLNR, GJA1, TNC при гризачи

За да проучим фенотипа на клетките, експресиращи APLNR, TNC, GJA1 и CD38, използвахме свободно достъпни бази данни, съдържащи транскриптомни данни от изолирани невронални стволови клетки в миши мозък (Таблица 4). Изолира-

нето на тези клетки е било осъществено благодарение на оцветяването на препарати от миши мозък за маркери като CD133 (prominin-1), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) и GFAP и последващото им изолиране с FACS (флуоресцентно активирано клетъчно сортиране) и секвениране. Сравнението ни показва, че избраните от нас гени са налични в клетки, спадащи към три различни субпопулации: qNSCs, aNSCs или астроцити. qNSCs представляват невронални стволови клетки, които са в състояние на „покой“ (не са пролиферативни). aNSCs представляват невронални стволови клетки, които са способни да се делят и диференцират в TAPs. Тук отново трябва да се спомем, че изолирането на този тип клетки при маймуна или човек е невъзможно поради липсата на експресия на CD133 в тази зона. Трябва да се направи важно уточнение, че APLNR не беше намерен в нито една от базите данни.

Открихме, че част от CD38+, GJA1+ и TNC+ клетки принадлежат към клас qNSCs, изолирани чрез флуоресцентна система за клетъчно сортиране, където са използвани маркерите GFAP, CD133 и EGFR, и впоследствие секвенирани.

В базата данни на Beckervordersandforth et al. не открихме съвпадения. Dulken et al. чрез секвенационни техники и машинно самообучение (от англ. Machine learning) успяват да класифицират отделните състояния на стволовите клетки в обединяващ ги континуум. При сравнение на избраните от нас гени установихме, че GJA1 спада към категория астроцити и qNSCs-like клетки, докато TNC спада към категория астроцити.

Llorens-Bobadilla et al. използват инсултено увреждане и секвенационни техники, за да изолират и характеризират различните състояния на стволовите клетки. При сравнението на данните открихме, че GJA1 е експресиран от qNSCs (primed). Трябва да се вземе под внимание, че всички описани проучвания, с които сравнихме нашите четири гена, са използвали модели за гризачи, а не примати.

Таблица 4: Сравнение на избраните от нас гени с отворени база данни, съдържащи информация за стволово-клетъчни популации, намиращи се в SVZ

Източник на данни	Описани клетъчни популации	Присъствие на избраните четири гена в конкретна клетъчна популация
Codega et al., 2014	qNSCs aNSCs	CD38, GJA1, TNC -
Beckervordersandforth et al., 2010	ependymal cells astrocyte aNSCs	- - -
Dulken et al., 2017	astrocyte qNSCs-like aNSCs-early aNSCs-late aNSCs-mid NPCs-like	GJA1, TNC GJA1 - - - -
Llorens-Bobadilla et al., 2015	class I (oligodendrocytes) class II (dormant qNSCs) class III (primed qNSCs) class IV (non-mitotic aNSCs) class V (mitotic aNSCs) class VI (TAPs) class VII (neuroblasts)	- - - - GJA1 - -

7.3. Диференциална експресия по ростро-каудалната ос на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 при макак

Повечето изследвания в областта на адултната невrogenеза се извършват посредством миши модели. Пространственото положение на стволовите клетки в мишият мозък е описано в няколко съобщения. Те показват наличието на клетки с характер на стволови, като основната част от тях се намират в най-ростралната част на вентрикула. Като измерваме количеството и нивата на позитивните клетки, ние показваме, че APLNR, TNC и CD38 образуват ростро-каудален градиент, като по-голямата част от клетките, които експресират тези гени, се намират в най-каудалната част на вентрикула (виж 6.3.1., 6.3.2., 6.3.3., 6.3.4.). От резултатите за GJA1 наблюдаваме еднакви стойности в ростралните и каудалните нива. Това вероятно показва наличието на различни субпопулации на стволови клетки, произвеждащи различни типове неврони. TNC, APLNR и CD38 показват ростро-каудален градиент на експресия, т.е. повишаване на експресията от рострално към каудално. За да разберем каква е причината за

този градиент, използвахме тъканни срези от същите нива и чрез имунохистохимия ги оцветихме за пролиферативния маркер Ki67 (виж 6.4.). Установихме по-голямо количество в Ki67⁺ клетки в ростралните нива и липса на такива в каудалните нива. Това може да се обясни с обстоятелството, че нашите данни показват завишени нива на TNC и CD38 в най-каудалната част на вентрикула, а транскриптомните данни ги типизират като qNSCs – клетки, които не са с висок пролиферативен индекс^{30, 31, 148}. Вероятно APLNR влиза в същата категория от клетки, но поради липсата му в транскриптомните данни от гризачи, заключения само въз основа на това не могат да бъдат дадени. Интересен факт е, че GJA1 беше открит във високи нива както в най-ростралната, така и в най-каудалната част на вентрикула, а в две от транскриптомните бази данни показват експресия в две различни клетъчни субпопулации aNCS и qNSC^{30, 31, 148}. Нашите резултати за наличието на различни клетъчни субпопулации следва да бъдат доразвити от транскриптомни данни, които използват три или повече нива по дължината на латералния вентрикул.

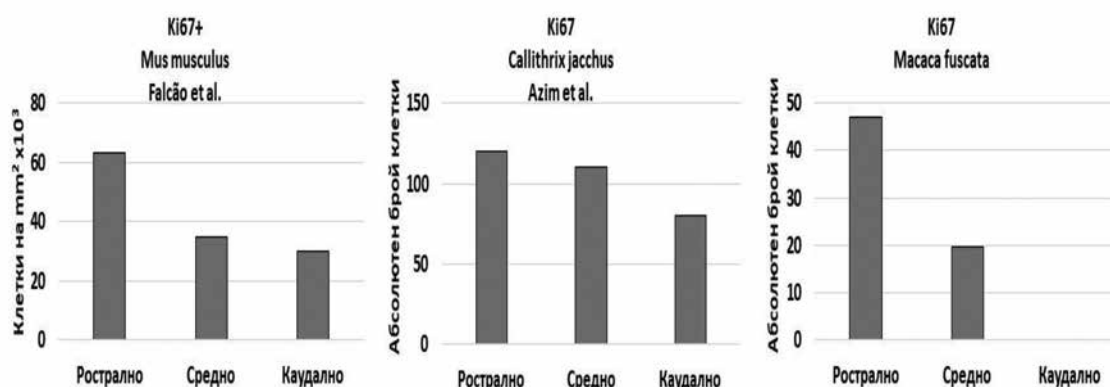
7.4. Сравнителен анализ на експресията на APLNR, TNC, CD38 и GJA1 с други бозайници

Получените резултати показват значителни различия в ростро-каудалната експресия на избраните от нас гени при трите изследвани животни. Както беше коментирано в глава 6.5., ростро-каудалната експресия на APLNR и TNC е възможно да се дължи на наличие на повече qNSCs в каудалните участъци, а относно GJA1 е възможно наличието на различни клетъчни групи: aNSCs, намиращи се рострално, и qNSCs, разположени каудално. Също така трябва да се отбележи, че е възможно NSCs в отделните региони по протежение на латералния вентрикул да произвеждат различни видове интерневрони със специфична функция при всеки от видовете. Това явление е описано при гризачи, където има ясно дефинирани прогениторни популации с регионално разпределение както по ростро-каудалната ос, така и в дорзо-вентралния участък на латералния вентрикул^{149, 150}. Подобни междувидови вариации в експресията на стволово-клетъчните гени могат да са вследствие на функционални или еволюционни причини, свързани с различните местообитания и поведение (търсене на храна, хранителни навици и други).

Трябва да се отбележи, че резултатите от тази част на изследването биха били по-точни, ако оцветяванията за трите вида бяха направени при едни и същи условия и от един и същ изследовател. Възможно е наличието на различия по отношение на интензитета, фоновото оцветяване и други.

7.5. Ростро-каудален градиент на експресията на Ki67 в SVZ при различни видове

Нашите резултати показаха намаляване на пролиферативните клетки по ростро-каудалната ос. Сравнявайки данни при гризач, мармозетка и японски макак, откриваме, че и там има ростро-каудален градиент с тенденция към намаляване, но броят на пролиферативните клетки е в пъти по-висок¹⁵¹ (Фиг. 23 и 61).



Фиг. 61: Схематично сравнение на наличието на пролиферативни клетки в мозък на мишка¹⁵¹, мозък на мармозетка¹⁵² и мозък на макак на три нива по ростро-каудалната ос.

При мишка се наблюдава огромен брой пролиферативни клетки, докато при мармозетка и японски макак тези клетки са малобройни. По ростро-каудалната ос може ясно да се види тенденцията за намаляване от рострално към каудално и при трите бозайника. Различията в пролиферативните способности на стволовите клетки, намиращи се в ростро-каудалната ос, могат да бъдат обяснени вероятно от специфичното разположение на невроналните стволови клетки и наличието на регионалност в производството на интерневрони. Ние смятаме, че различията в пролиферацията

могат да се дължат и на различното устройство на SVZ при трите бозайника, близостта на епендима, кръвоносни съдове и др. Необходими са допълнителни изследвания, насочени към изясняване на морфологичните и молекулярните различия между тези бозайници.

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

7.6.1. Фенотипна характеристика на TNC в нормален маймунски мозък

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

Tenascin-C е олигомерен екстрацелуларен протеин, съдържащ мономери, изградени от различни домейни като Tenascin assembly domain (TA), разположен в N-терминала, както и от EGFR-like (Epidermal Growth Factor Receptor-like) повторки, повторки тип Fibronectin III (фибронектин III, FN III) и C-терминал, изграден от глобуларен фибриноген. В ЦНС се открива около неврони и глия. Наличен е и в стволово-клетъчни ниши (stem cell niches) като интестиналните крипти, костния мозък и космените фоликули. При възрастни индивиди се експресира в тъкани, подложени на опън (сухожилия). Също така неговото присъствие е описано при редица патологични състояния: туморни маси, възпаление, механични и химични травми, като експресията му се усилва при тъканно възстановяване^{153,154}. Като част от екстрацелуларния матрикс (ECM, extracellular matrix) Tenascin-C е пряко свързан с адхезията към други ECM протеини като фибронектин, интегрин, колаген, периостин, фибрилилин-2 и други^{153, 154}. Tenascin-C има възможност да активира EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), като по този начин стимулира клетъчната пролиферация. В допълнение, TNC може да взаимодейства с разтворими фактори като TGFβ (Transforming Growth Factor beta), Wnt3a (Wingless 3a) и VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)¹⁵⁵. Tenascin-C може да бъде открит и в SVZ при гризачи, ограничен в SEL (subependymal layer, субепендимен слой) и RMS (rostral migratory stream, рострална миграционна система). В SVZ

той може да бъде намерен в GFAP⁺ клетки, най-вероятно невронални стволови клетки, но отсъства в клетки, експресиращи маркери като PSA-NCAM (Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule), маркиращ невробласти, и Ascl1 (Achaete-scute homolog 1), маркиращ транзиторни амплификационни клетки (TAPs, transit-amplifying progenitor cells)¹⁵⁶. Като използват мутантна мишка с LacZ касета, елиминираща гена за TNC, Казанис и колеги се опитват да разберат значението на TNC за невrogenезата в SVZ. Те откриват увеличено количество групи от невробласти в SVZ, но липса на различия в невробластите, намиращи се в ОБ. Липсата на TNC обаче не показва разлики в броя както на епендимните клетки, така и на TAPs, Olig2⁺, GFAP⁺ или PSA-NCAM⁺ клетки. Хетерозиготната мишка не показва различия в клетъчната пролиферация¹⁵⁶.

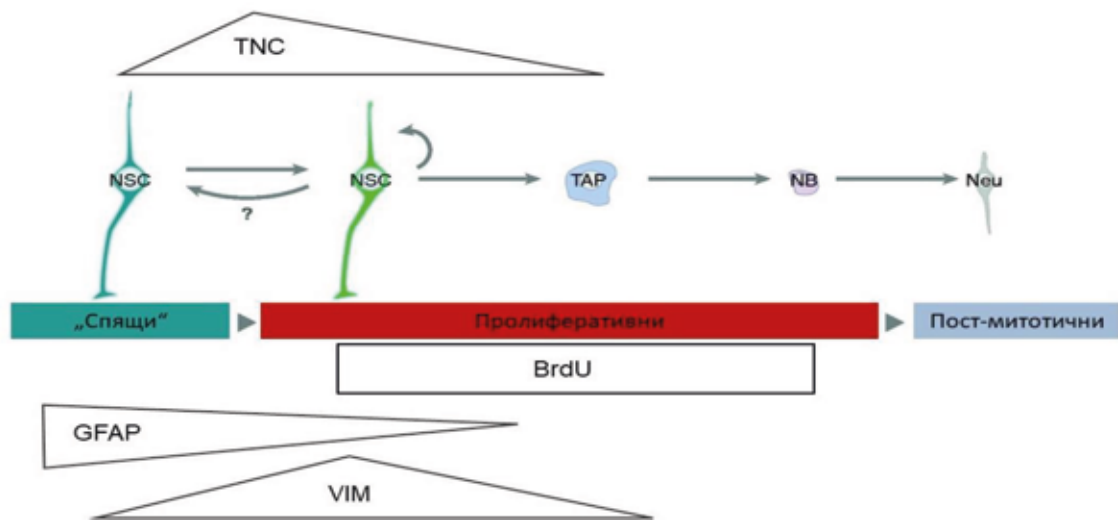
При обобщаване на резултатите от фенотипизацията могат да се изведат съответните заключение за характера на TNC⁺ клетки в SVZ при маймуна: те се експресират в голяма част от GFAP⁺ (qNSCs или aNSCs) клетки (32%) и VIM⁺ (aNSCs или TAPs) клетки (22%). Данните от тройното оцветяване GFAP/TNC/BrdU могат да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

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

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

Фенотипът на TNC⁺ клетки е представен на Фиг. 62.

Характер на клетките, експресиращи TNC



Фиг. 62: Вероятен фенотип на клетките, експресиращи TNC.

Схематично представяне на фазите на диференциация, на състоянията на невроналните стволови клетки или клетките, произлизащи от тях. Представен е възможният характер на TNC⁺ при маймуна – положение между qNSCs и aNSCs. С модификации по Otsuki L, Brand AH, „The vasculature as a neural stem cell niche”²²

7.6.2. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален маймунски мозък

APLNR е G протеин-свързан рецептор от клас A (родопсин-подобен рецептор субклас A3, съдържащ 380 aa (amino acids, аминокиселини), с характерната 7-трансмембранна алфа-хеликсна структура^{157, 158}.

APLNR е широко застъпен в животинското царство и се експресираща в мишка, плъх, човек, маймуна и говеда. По-нисши гръбначни като кокошка, зебрафиш, таласпия и други също експресират варианти на APLNR (APLNR1, 2, 2a, 2b, 3a), показващи различна хомология спрямо човешкия APLNR^{43,144,159–163}. Описаните лиганди, способни да активират рецептора, са апелин-13, апелин-17, апелин-36, апелин-55 и Елабела (Elabela/Toddler)^{164, 165}.

В литературата мозъчната експресия на апелинергичната система е добре проучена и описана, като са използвани различни молекулярни и хистологични методики. APLNR и APLN се откриват както в ЦНС, така и в ПНС. Топографията на експресия обуславя и разнообразни роли в тези системи: отделяне на хипофизарни хормони,

контролиране на водната хомеостаза, регулация на кръвното налягане, регулация на храненето и други^{43,166–168}.

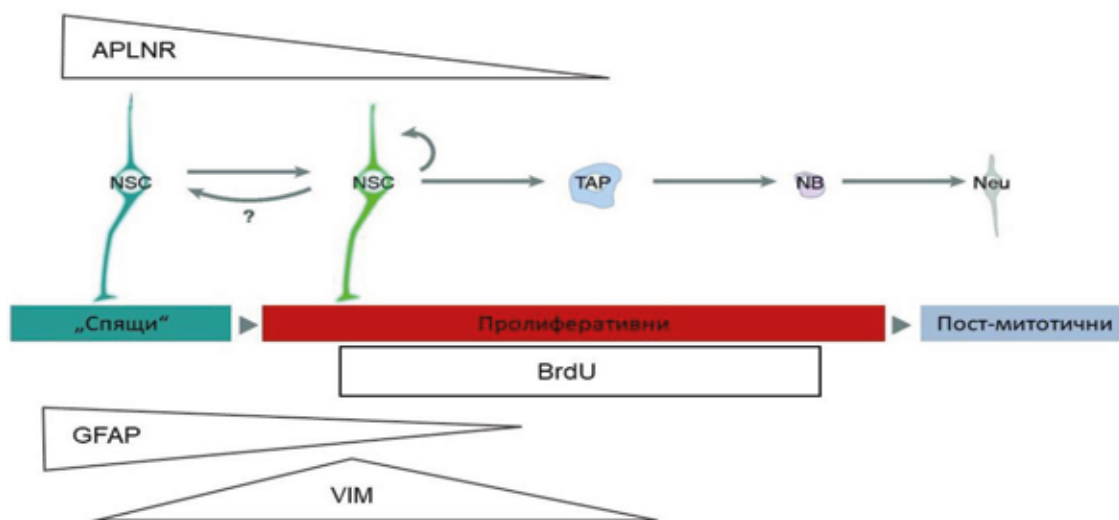
APLNR се открива в неврони, олигодендроцити и астроцити, но не и в микроглия, докато лигандът апелин се експресира от неврони, но не и астроцити^{169–173}.

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

Приложението на BrdU само за 5 дни обуславя възможността да бъдат маркирани не само aNSCs, но и TAPs, които са силно пролиферативни (виж 5.10.). Данните от двойното оцветяване за APLNR/BrdU показват, че APLNR се експресира в минимална степен от aNSCs и TAPs (4%). Посочените резултати могат да бъдат интерпретирани по следния начин: тройнопозитивните APLNR⁺GFAP⁺VIM⁺ клетки са субпопулация от aNSCs (15%), тъй като GFAP се експресира в qNSCs и aNSCs, а Vim в aNSCs и TAPs. Субпопулацията от APLNR⁺GFAP⁺VIM⁻ (50%) представлява qNSCs поради липсата на Vim. Това демонстрира намаляване на експресията на APLNR в прехода qNSCs → aNSCs → TAPs (qNSCs = APLNR⁺GFAP⁺VIM⁻ (50%); aNSCs = APLNR⁺GFAP⁺VIM⁺ (15%); aNSCs/TAPs = APLNR/BrdU (4%); TAPs = APLNR⁺GFAP⁻VIM⁺ (8%) (Фиг. 63).

Поради факта, че APLNR се експресира и в кръвоносни съдове, ние направихме двойно и тройно оцветяване с маркерите VIM и GLUT1. От получените резултати установихме, че 12% от всички клетки са двойнопозитивни за APLNR⁺GLUT1⁺, а 10.5% са тройнопозитивни за APLNR⁺GLUT1⁺VIM⁺, което е в потвърждение на досегашните данни при гризачи за наличието на APLNR в кръвоносните съдове.

Характер на клетките, експресиращи APLNR



Фиг. 63: Вероятен фенотип на клетките, експресиращи APLNR.

Схематично представяне на фазите на диференциация, на състоянията на невроналните стволови клетки или клетките, произлизащи от тях. Представен е възможният характер на APLNR⁺ клетки при маймуна: qNSCs → aNSCs → TAPs. С модификации по Otsuki L, Brand AH, „The vasculature as a neural stem cell niche”²²

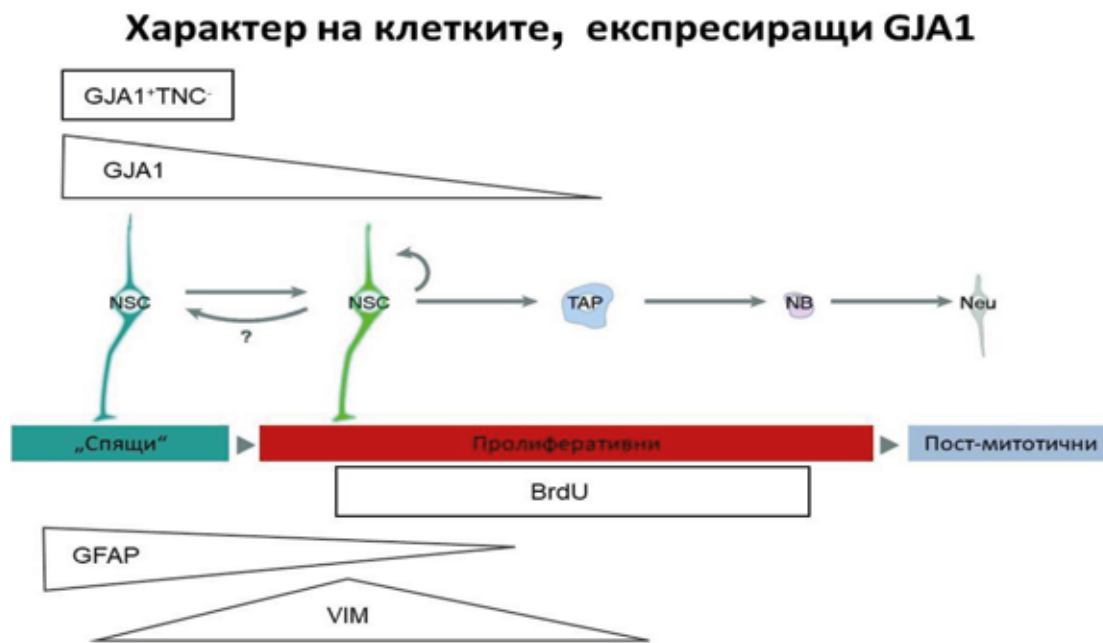
7.6.3. Фенотипна характеристика на GJA1 в нормален маймунски мозък

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

Нашите резултати показаха, че GJA1 се експресира както от GFAP⁺ (aNSCs или qNSCs) клетки (58%), така и от VIM⁺ (aNSCs или TAPs) клетки (16.4%). Методът на приложение на BrdU би маркирал само aNSCs или TAPs, като 4% от всички BrdU⁺

клетки са позитивни за GJA1. Резултатите ни показаха също, че по-малко от 1% са пролиферативни aNSCs, изследвани чрез тройно оцветяване за GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁺. Субпопулацията GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁺ би маркирала aNSCs (1.5% от GJA1), докато GFAP⁺GJA1⁺BrdU⁻ би маркирала субпопулацията от qNSCs (57%). Това демонстрира факта, че GJA1 се експресира в голяма степен в qNSCs и в по-малка степен в aNSCs и TAPs (Фиг. 64).

Настоящите резултати са в единодушие със скорошни данни, показващи ролята на GJA1 в поддържането на пролиферацията и самовъзпроизвеждането на NSCs¹⁷⁶. Чрез оцветявания в комбинация с TNC допълнително открихме субпопулация от клетки TNC⁻GJA1⁺, която е негативна както за VIM, така и за BrdU, което демонстрира, че тези клетки са qNSCs (Фиг. 64).



Фиг. 64: Вероятен фенотип на клетките, експресиращи GJA1.

Схематично представяне на фазите на диференциация, на състоянията на невроналните стволови клетки или клетките, произлизащи от тях.

Представен е възможният характер на GJA1 позитивните клетки при маймуна:

qNSCs → aNSCs → TAPs.

GJA1⁺TNC⁻ представляват вероятно клетъчна популация от qNSCs.

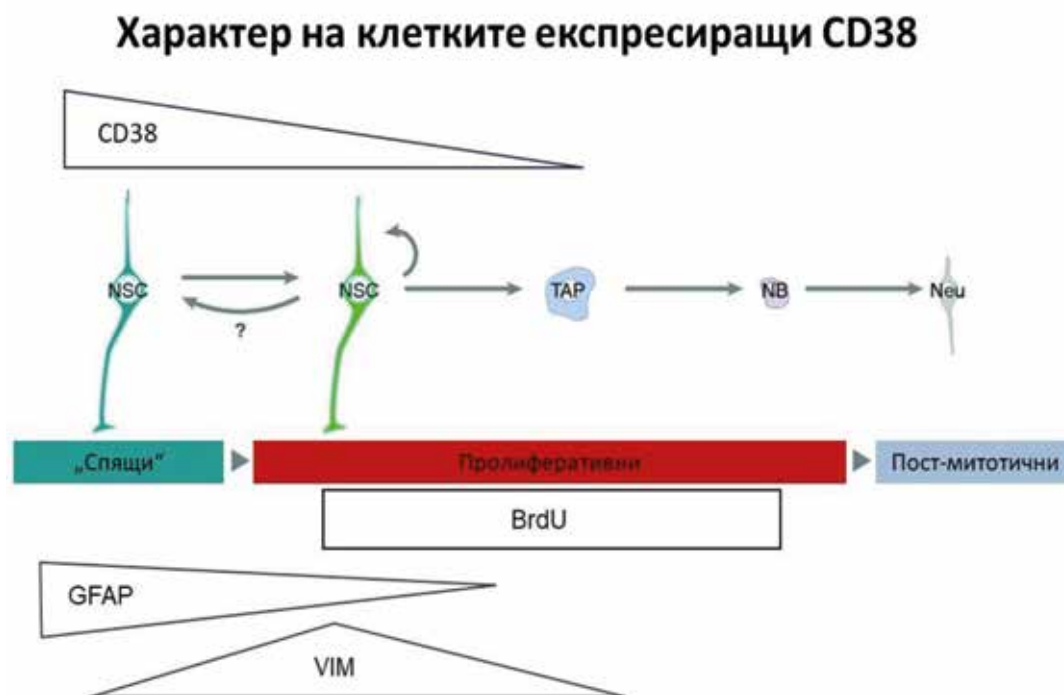
С модификации по Otsuki L, Brand AH, „The vasculature as a neural stem cell niche”²²

7.6.4. Фенотипна характеристика на CD38 в нормален маймунски мозък

CD38 е 45 kDa трансмембранен гликопротеин, съставен от къса цитоплазмена опашка (аминокиселина 1–21), трансмембранен домен (аминокиселина 22–42) и извънклетъчен домен (аминокиселина 43–300). CD38 има както рецепторна, така и ензимно-медирана функция. Като ектоензим CD38 е многофункционален протеин, който катализира няколко реакции: (i) превръщането на NAD в аденозин дифосфат-рибоза (ADPR); (ii) превръщането на NAD в цикличен ADPR (сADPR, циклазна активност); (iii) хидролизата на сADPR в ADPR; (iv) в присъствието на никотинова киселина (NA) и в киселинни условия превръщането на NADP, фосфорилирания еквивалент на NAD, в никотинова киселина аденин динуклеотид фосфат (NAADP); (v) превръщането на NAADP в ADPR фосфат (ADPRP). CD38 също е в състояние да катализира разграждането на прекурсора на NAD никотинамид мононуклеотид (NMN) в никотинамид. Като рецептор CD38 взаимодейства със своя лиганд CD31¹⁷⁷. CD31, известен също като PECAM-1, е 130 kDa тип I трансмембранен гликопротеин, който се състои от шест екстрацелуларни имуноглобулиноподобни хомоложни домена, 19-остатъчен трансмембранен домен и 118-остатъчна цитоплазмена опашка¹⁷⁷. Експресията на CD31 се наблюдава главно в ендотелните клетки, където се счита за конститутивен маркер, докато тази на CD38 се наблюдава почти във всички области на мозъка и се открива при статистически значимо по-високи от средните нива в п. caudatus, palium, bulbus olfactorius, putamen и thalamus. На клетъчно ниво CD38 се експресира в неврони, астроцити и микроглиални клетки в плъх и човек. В невроните CD38 се открива главно в перикариона, но също и в дендритите. На субклетъчно ниво в мозъка на мишката CD38 се намира най-вече на плазмената мембрана, но присъства и вътреклетъчно^{174, 178, 179}.

Фенотипната характеристика на CD38 показва, че генът се експресира от GFAP⁺ (62.8%) и от VIM⁺ клетки (23.5%), като малка част от CD38⁺ пролиферират (3.4%). С допълнителни оцветявания, които съчетават маркерите GFAP⁺VIM⁺CD38⁺, забелязахме, че част от клетките са тройнопозитивни GFAP⁺VIM⁺CD38⁺ (16%), но и че се отличава клетъчна фракция с фенотип GFAP⁺VIM⁻CD38⁺ (44%). Тези резултати показват, че тройнопозитивните GFAP⁺VIM⁺CD38⁺ клетки представляват aNCSs (16%), GFAP⁺VIM⁻CD38⁺ принадлежат към qNSCs (46%), докато GFAP⁻VIM⁺CD38⁺ са TAPs

(7%). Това показва, че генът се експресира във високи количества в qNSCs (46%), след това спада при aNSCs (16%) и при TAPs (7%). Това демонстрира намаляване на експресията на CD38 в прехода qNSCs → aNSCs → TAPs (qNSCs = CD38⁺GFAP⁺VIM⁻ (46%); aNSCs = CD38⁺GFAP⁺VIM⁺ (16%); aNSCs/TAPs = CD38/BrdU (3.4%); TAPs = CD38⁺GFAP⁻VIM (7%) (Фиг. 65).



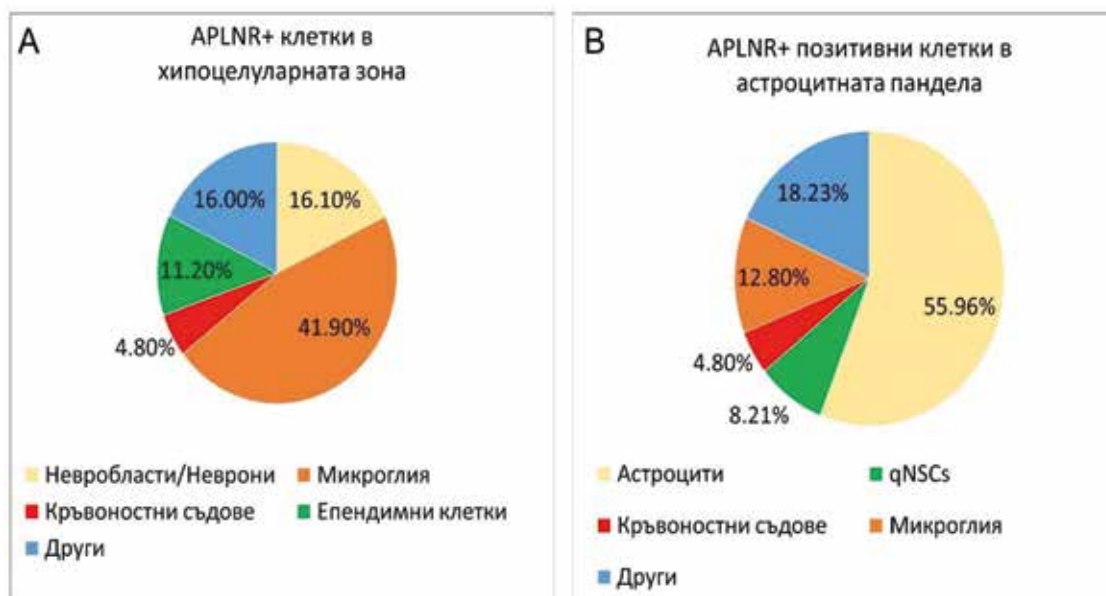
Фиг. 65: Вероятен фенотип на клетките, експресиращи CD38.

Схематично представяне на фазите на диференциация, на състоянията на невроналните стволови клетки или клетките, произлизащи от тях. Представен е възможният характер на CD38⁺ клетки при маймуна: qNSCs → aNSCs → TAPs. С модификации по Otsuki L, Brand AH, „The vasculature as a neural stem cell niche”²²

7.7. Фенотипна характеристика на APLNR в нормален човешки мозък

Както беше споменато по-горе (7.4.2.), APLNR се експресира и в човешки мозък. Поради факта, че от четирите избрани гени APLNR представлява най-лесният за фармакологично повлияване чрез лиганда апелин, използвахме нормални човешки мозъци, за да проучим наличието и фенотипа му в SVZ. APLNR се открива и в трите слоя на SVZ (епендимен слой, гап зона и субепендимен слой). В комбина-

ция с различни маркери за стволови/прогениторни клетки открихме, че APLNR се експресира от GFAP⁺ клетки, намиращи се в астроцитната панделка. Използвайки тройна комбинация APLNR/GFAP/Ki67, установихме, че повечето от APLNR⁺ клетки са активно пролифериращи (16 от 17 клетки), а само 2 са тройнопозитивни за GFAP/APLNR/Ki67. Наличието на малко Ki67⁺ клетки е в съответствие с предишни публикации^{28, 38, 45, 46}. Пролифериращи епендимни клетки не бяха открити, което потвърждава факта, че те са пост-митотични¹⁴⁵. GFAP δ е изоформа на GFAP, експресираща се само в субпопулация от астроцити в SGZ (subgranular zone, субгрануларна зона на хипокампа), субпалиума и в астроцитната панделка на SVZ, като процесите им се намират в гап зоната^{26, 33}. В допълнение, GFAP δ се експресира от пролифериращи клетки, маркирани с PCNA и BrdU и налични в невросфери (от англ. neurospheres) от адултен човешки мозък, т.е. те представляват бавно пролифериращи NSCs. От нашите резултати е видно, че APLNR се експресира и в GFAP δ ⁺ клетки. Видяхме също, че APLNR се експресира и от други клетъчни популации, свързани с различните стадии на невrogenеза (β -III-tubulin) или с клетки, асоциирани със стволово-клетъчната ниша (GLUT1, Iba1, s100b) (Фиг. 66). 16% и съответно 18% от APLNR⁺ клетки са с неясен фенотип, вероятно представляващи TAPs (Фиг. 66). Беше показано, че апелин лигандът се експресира в субвентрикуларната зона, като клетките, експресиращи протеина, притежават множество дълги израстъци, вероятно стигащи до клетки, експресиращи APLNR, като по този начин ги активират. Допълнително трябва да бъдат изяснени механизмът и значението на апелинергичната система в невrogenната ниша при хора.



Фиг. 66: Процентно съдържание на APLNR+ клетки в хипоцелуларната зона (A) и съответно астроцитната панделка (B). Различните клетъчни субпопулации са маркирани в различни цветове. В синьо (Други) представляват процентното съдържание на APLNR⁺ с неясен фенотип.

8. НЕДОСТАТЪЦИ НА НАСТОЯЩОТО ПРОУЧВАНЕ

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

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

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

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

маркира именно тях. В допълнение, би било от полза да се изследва експресията на избраните гени в комбинация с относително специфични маркери, експресирани в невробласти и TAPs, като DCX, β -III-tubulin и респективно EGFR.

Както беше отбелязано в глава (виж 6.6.6.), беше установено различно количество на експресия на GFAP и Vim в ростро-каудалната ос. Това означава, че клетъчните субпопулации, маркирани с тези два маркера (aNSCs, qNSCs, TAPs), са с различно разположение по ростро-каудалната ос и притежават различни функции. Би било от полза следващи проучвания да направят по-детайлна характеристика на фенотипа на различните избрани от нас гени по ростро-каудалната ос.

9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

10. ИЗВОДИ

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

11. СПРАВКА ЗА ПРИНОСА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

12. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДОКТОРАНТУРАТА

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

13. ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДОКТОРАНТУРАТА

Доклади във връзка с докторантурата

Национални:

1. VII National Conference with International participation “Morphological Days”
June 8–10 2018
2. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society May 31 – June
2 2019
3. XXVI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society September
29-October 01 2023

Международни:

1. X International Symposium on Clinical Anatomy October 6 – 8 2016
2. Humboldt Kolleg Science without borders: Alexander von Humboldt’s Concepts
in Today’s World Varna, September 18-21, 2019
3. Black Sea Neurogenesis 2023, Varna, Bulgaria, 01-03 June 2023, Poster
4. Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions 07 – 10 September 2023 |
Alicante, Spain- Poster
5. XI International Symposium on Clinical Anatomy October 2 – 4 2020 (virtual
meeting)

14. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Sanai, N. Unique Astrocytes Ribbon. *Nature* 427, 740–744 (2004).
2. Leonard, B. W. *et al.* Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J. Comp. Neurol.* 515, 269–294 (2009).
3. Ming, G. li & Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702 (2011).
4. Bond, A. M., Ming, G. L. & Song, H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17, 385–395 (2015).
5. Li, Y. & Guo, W. Neural Stem Cell Niche and Adult Neurogenesis. *Neuroscientist* 27, 235–245 (2021).
6. Sorrells, S. F. *et al.* Immature excitatory neurons develop during adolescence in the human amygdala. *Nat. Commun.* 10, 2748 (2019).
7. García-González, D. *et al.* Neurogenesis of medium spiny neurons in the nucleus accumbens continues into adulthood and is enhanced by pathological pain. *Mol. Psychiatry* (2020) doi:10.1038/s41380-020-0823-4.
8. Ernst, A. *et al.* Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–1083 (2014).
9. Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278 (2008).
10. Garcia-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *J. Neurobiol.* 36, 234–248 (1998).
11. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716 (1999).
12. Velloso, F. J., Shankar, S., Parpura, V., Rakic, P. & Levison, S. W. Neural Stem Cells in Adult Mammals are not Astrocytes. *ASN Neuro* 14, (2022).

13. Mirzadeh, Z. *et al.* Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanyctytic territories. *Nat. Commun.* 8, 13759 (2017).
14. Carlén, M. *et al.* Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.* 12, 259–267 (2009).
15. Shah, P. T. *et al.* Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell* 173, 1045-1057.e9 (2018).
16. Chaker, Z., Codega, P. & Doetsch, F. A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, 640–658 (2016).
17. Shook, B. A., Manz, D. H., Peters, J. J., Kang, S. & Conover, J. C. Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *J. Neurosci.* 32, 6947–6956 (2012).
18. Codega, P. *et al.* Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545–559 (2014).
19. Culver, J. C., Vadakkan, T. J. & Dickinson, M. E. A Specialized Microvascular Domain in the Mouse Neural Stem Cell Niche. *PLoS ONE* 8, (2013).
20. Tavazoie, M. *et al.* A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–288 (2008).
21. Shen, Q. *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338–1340 (2004).
22. Otsuki, L. & Brand, A. H. The vasculature as a neural stem cell niche. *Neurobiol. Dis.* 107, 4–14 (2017).
23. Shen, Q. *et al.* Adult SVZ Stem Cells Lie in a Vascular Niche: A Quantitative Analysis of Niche Cell-Cell Interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289–300 (2008).
24. Gonzalez-Perez, O. Stem cells in the adult human brain. *Biol Biomed Rep* 2(1), 59–69 (2012).
25. de Sonnaville, S. F. A. M. *et al.* The adult human subventricular zone: partial ependymal coverage and proliferative capacity of cerebrospinal fluid. *Brain Commun.* 2, 1–17 (2020).
26. Roelofs, R. F. *et al.* Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia* 52, 289–300 (2005).

27. Jabeti, R., Mirsadeghi, S. & Kiani, S. In vitro characterization of subventricular zone isolated neural stem cells, from adult monkey and rat brain. *Mol. Biol. Rep.* 48, 1311–1321 (2021).
28. Kukekov, V. G. *et al.* Multipotent Stem/Progenitor Cells with Similar Properties Arise from Two Neurogenic Regions of Adult Human Brain. *Exp. Neurol.* 156, 333–344 (1999).
29. Beckervordersandforth, R. & Rolando, C. Untangling human neurogenesis to understand and counteract brain disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 50, 67–73 (2020).
30. Codega, P. *et al.* Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545–559 (2014).
31. Llorens-Bobadilla, E. *et al.* Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* (2015) doi:10.1016/j.stem.2015.07.002.
32. Dulken, B. W., Leeman, D. S., Boutet, S. C., Hebestreit, K. & Brunet, A. Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep.* 18, 777–790 (2017).
33. van den Berge, S. A. *et al.* Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP- δ . *Aging Cell* 9, 313–326 (2010).
34. van Strien, M. E. *et al.* Isolation of Neural Progenitor Cells From the Human Adult Subventricular Zone Based on Expression of the Cell Surface Marker CD271. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 470–480 (2014).
35. Donega, V. *et al.* Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 84 (2019).
36. Donega, V. *et al.* Single-cell profiling of human subventricular zone progenitors identifies SFRP1 as a target to re-activate progenitors. *Nat. Commun.* 13, (2022).
37. Sanai, N. *et al.* Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. (2011) doi:10.1038/nature10487.
38. Quiñones-Hinojosa, A. *et al.* Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415–434 (2006).

39. Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Gonzalez-Perez, O. & Garcia-Verdugo, J. M. The Human Brain Subventricular Zone: Stem Cells in This Niche and Its Organization. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 18, 15–20 (2007).
40. Wang, C. *et al.* Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 34, 10906–10923 (2014).
41. Wang, C. *et al.* Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534–1550 (2011).
42. Pfenninger, C. V. *et al.* CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res.* 67, 5727–5736 (2007).
43. Chongtham, M. C. *et al.* Transcriptome Response and Spatial Pattern of Gene Expression in the Primate Subventricular Zone Neurogenic Niche After Cerebral Ischemia. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–17 (2020).
44. Monkey Niche. <http://monkey-niche.org/>.
45. Wang, C. *et al.* Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534–1550 (2011).
46. Dennis, C. V., Suh, L. S., Rodriguez, M. L., Kril, J. J. & Sutherland, G. T. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 621–638 (2016).
47. Quiñones-Hinojosa, A. *et al.* Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415–434 (2006).
48. Curtis, M. A. *et al.* Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington’s disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9023–9027 (2003).
49. Curtis, M. A. *et al.* The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington’s disease human brain. *Neuroscience* 132, 777–788 (2005).

50. Dennis, C. V., Suh, L. S., Rodriguez, M. L., Kril, J. J. & Sutherland, G. T. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 621–638 (2016).
51. Quiñones-Hinojosa, A. & Chaichana, K. The human subventricular zone: A source of new cells and a potential source of brain tumors. *Exp. Neurol.* 205, 313–324 (2007).
52. Sorrells, S. F. *et al.* Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377–381 (2018).
53. Parolisi, R., Cozzi, B. & Bonfanti, L. Humans and dolphins: Decline and fall of adult neurogenesis. *Front. Neurosci.* 12, 1–8 (2018).
54. Parolisi, R., Cozzi, B. & Bonfanti, L. Non-neurogenic SVZ-like niche in dolphins, mammals devoid of olfaction. *Brain Struct. Funct.* 222, 2625–2639 (2017).
55. Kang, H. J. *et al.* Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483–489 (2011).
56. Curtis, M. A. *et al.* Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension. *Science* 315, 1243–1249 (2007).
57. Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A. D. & Sánchez-Acuña, G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal* 18, (2013).
58. Reif, A. *et al.* Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. 514–522 (2006) doi:10.1038/sj.mp.4001791.
59. Galán, L., Gómez-Pinedo, U., Guerrero, A., García-Verdugo, J. M. & Matías-Guiu, J. Amyotrophic lateral sclerosis modifies progenitor neural proliferation in adult classic neurogenic brain niches. *BMC Neurol.* 17, 1–10 (2017).
60. Tobin, M. K. *et al.* Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer’s Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24, 974-982.e3 (2019).
61. Kleindorfer, D. O. *et al.* 2021 Guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack; A guideline from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* (2021). doi:10.1161/STR.0000000000000375.
62. Kleinschnitz, C., Fluri, F. & Schuhmann, M. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des. Devel. Ther.* 3445 (2015) doi:10.2147/DDDT.S56071.

63. Luengo-Fernandez, R., Violato, M., Candio, P. & Leal, J. Economic burden of stroke across Europe: A population-based cost analysis. *Eur. Stroke J.* 5, 17–25 (2020).
64. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary. *Eur. Heart J. – Qual. Care Clin. Outcomes* 8, 377–382 (2022).
65. Virani, S. S. *et al.* Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* (2020). doi:10.1161/CIR.0000000000000757.
66. Zhao, T. *et al.* Neural Stem Cells Therapy for Ischemic Stroke: Progress and Challenges. *Transl. Stroke Res.* 13, 665–675 (2022).
67. Feske, S. K. Ischemic Stroke. *Am. J. Med.* 134, 1457–1464 (2021).
68. Alonso de Leciana, M. *et al.* Guidelines for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neurol. Engl. Ed.* 29, 102–122 (2014).
69. Henderson, S. J., Weitz, J. I. & Kim, P. Y. Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 16, 1932–1940 (2018).
70. Grunwald, I. Q. *et al.* Endovascular stroke treatment today. *Am. J. Neuroradiol.* 32, 238–243 (2011).
71. Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H. J. & Okano, H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 292–301 (2003).
72. Tonchev, A. B., Yamashima, T., Sawamoto, K. & Okano, H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 81, 776–788 (2005).
73. Tang, H. *et al.* Effect of neural precursor proliferation level on neurogenesis in rat brain during aging and after focal ischemia. *Neurobiol. Aging* 30, 299–308 (2009).
74. Tajiri, N. *et al.* In Vivo Animal Stroke Models. *Transl. Stroke Res.* 4, 308–321 (2013).
75. Tonchev, A. B. Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates. *Arch. Ital. Biol.* 149, 225–231 (2011).
76. Tonchev, A. B. Количество и фенотип на пролифериращи клетки в постисхемичния мозък на възрастни маймуни-- PhD thesis- prof. Anton Tonchev. (2003).

77. Sharp, F. R., Liu, J. & Bernabeu, R. Neurogenesis following brain ischemia. *Dev. Brain Res.* 134, 23–30 (2002).
78. Harris, L., Zalucki, O. & Piper, M. BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations. *J. Mol. Histol.* 49, 229–234 (2018).
79. Zhang, R. L. *et al.* Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 857–863 (2006).
80. Zhang, R. L. *et al.* Reduction of the Cell Cycle Length by Decreasing G 1 Phase and Cell Cycle Reentry Expand Neuronal Progenitor Cells in the Subventricular Zone of Adult Rat after Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 857–863 (2006).
81. Kang, S. S. *et al.* Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. *Neurobiol. Dis.* 49, 68–78 (2013).
82. Tang, H. *et al.* Endogenous Neural Stem Cell–induced Neurogenesis after Ischemic Stroke: Processes for Brain Repair and Perspectives. *Transl. Stroke Res.* (2022) doi:10.1007/s12975-022-01078-5.
83. Marlier, Q., Verteneuil, S., Vandenbosch, R. & Malgrange, B. Mechanisms and Functional Significance of Stroke-Induced Neurogenesis. *Front. Neurosci.* 9, 1–16 (2015).
84. Wang, J. *et al.* Alpha-7 Nicotinic Receptor Signaling Pathway Participates in the Neurogenesis Induced by ChAT-Positive Neurons in the Subventricular Zone. *Transl. Stroke Res.* 8, 484–493 (2017).
85. Sinner, D. I., Kim, G. J., Henderson, G. C. & Igal, R. A. StearoylCoA desaturase-5: A novel regulator of neuronal cell proliferation and differentiation. *PLoS ONE* 7, (2012).
86. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418 (2011).
87. Poplineau, M. *et al.* PLZF limits enhancer activity during hematopoietic progenitor aging. *Nucleic Acids Res.* 47, 4509–4520 (2019).
88. Gaber, Z. B., Butler, S. J. & Novitch, B. G. PLZF Regulates Fibroblast Growth Factor Responsiveness and Maintenance of Neural Progenitors. *PLoS Biol.* 11, (2013).

89. Ivanov, M. N., Stoyanov, D. S., Pavlov, S. P. & Tonchev, Anton. B. Distribution, Function, and Expression of the Apelinergic System in the Healthy and Diseased Mammalian Brain. *Genes* 13, 2172 (2022).
90. Frisch, A. *et al.* Apelin controls angiogenesis-dependent glioblastoma growth. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19 (2020).
91. Harford-Wright, E. & Gavard, J. Apelin, the Devil Inside Brain Tumors. *J. Exp. Neurosci.* 12, 3–5 (2018).
92. Harford-Wright, E. *et al.* Pharmacological targeting of apelin impairs glioblastoma growth. *Brain* 140, 2939–2954 (2017).
93. Yang, Y. *et al.* Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Neurosci. Lett.* 568, 44–49 (2014).
94. Chen, D., Lee, J., Gu, X., Wei, L. & Yu, S. P. Intranasal delivery of apelin-13 is neuroprotective and promotes angiogenesis after ischemic stroke in mice. *ASN Neuro* (2015) doi:10.1177/1759091415605114.
95. Xin, Q. *et al.* Neuroprotective effects of apelin-13 on experimental ischemic stroke through suppression of inflammation. *Peptides* 63, 55–62 (2015).
96. Masoumi, J. *et al.* Apelin, a promising target for Alzheimer disease prevention and treatment. *Neuropeptides* 70, 76–86 (2018).
97. Luo, H. *et al.* Apelin-13 suppresses neuroinflammation against cognitive deficit in a streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease through activation of BDNF-TrkB signaling pathway. *Front. Pharmacol.* 10, (2019).
98. Kalantaripour, T. P., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Asadi-Shekaari, M. & Pasban-Aliabadi, H. Anticonvulsant and neuroprotective effects of apelin-13 on pentylenetetrazole-induced seizures in male rats. *Biomed. Pharmacother.* 84, 258–263 (2016).
99. Zhang, X. *et al.* Up-regulation of apelin in brain tissue of patients with epilepsy and an epileptic rat model. *Peptides* 32, 1793–1799 (2011).
100. Foroughi, K., Khaksari, M., Rahmati, M., Bitaraf, F. S. & Shayannia, A. Apelin-13 Protects PC12 Cells Against Methamphetamine-Induced Oxidative Stress, Autophagy and Apoptosis. *Neurochem. Res.* 44, 2103–2112 (2019).

101. Cheng, B., Chen, J., Bai, B. & Xin, Q. Neuroprotection of apelin and its signaling pathway. *Peptides* 37, 171–173 (2012).
102. De Falco, M. *et al.* Apelin expression in normal human tissues. *Vivo Athens Greece* 16, 333–6 (2002).
103. Beiriger, J. *et al.* The Subventricular Zone in Glioblastoma: Genesis, Maintenance, and Modeling. *Front. Oncol.* 12, 6–12 (2022).
104. Zhang, G. L., Wang, C. F., Qian, C., Ji, Y. X. & Wang, Y. Z. Role and mechanism of neural stem cells of the subventricular zone in glioblastoma. *World J. Stem Cells* 13, 877–893 (2021).
105. Liu, Y. W. J. *et al.* Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain. *Eur. J. Neurosci.* 28, 2254–2265 (2008).
106. Verwer, R. W. H. *et al.* Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin. *Brain* 130, 3321–3335 (2007).
107. Zwirner, J. *et al.* GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. *Int. J. Legal Med.* 135, 2323–2333 (2021).
108. Moreno-Jiménez, E. P. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease. *Nat. Med.* 25, 554–560 (2019).
109. Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A. & Llorens-Martín, M. Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. *J. Neurosci.* 41, 2541–2553 (2021).
110. Flor-García, M. *et al.* Unraveling human adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Protoc.* 15, 668–693 (2020).
111. Webster, J. D., Solon, M. & Gibson-Corley, K. N. Validating Immunohistochemistry Assay Specificity in Investigative Studies: Considerations for a Weight of Evidence Approach. *Vet. Pathol.* 58, 829–840 (2021).
112. Oszolak, F. & Milos, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87–98 (2011).
113. Franjic, D. *et al.* Transcriptomic taxonomy and neurogenic trajectories of adult human, macaque, and pig hippocampal and entorhinal cells. *Neuron* 110, 452–469.e14 (2022).

114. Chongtham, M. C. *et al.* Transcriptome Response and Spatial Pattern of Gene Expression in the Primate Subventricular Zone Neurogenic Niche After Cerebral Ischemia. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–17 (2020).
115. Kam, M. *et al.* The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 37, 196–205 (2009).
116. Brossa, A. *et al.* Role of CD133 Molecule in Wnt Response and Renal Repair. *Stem Cells Transl. Med.* 7, 283–294 (2018).
117. Hara, K. *et al.* Anomaly in aortic arch alters pathological outcome of transient global ischemia in Rhesus macaques. *Brain Res.* 1286, 185–191 (2009).
118. Lein, E. S. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176 (2007).
119. Yaylaoglu, M. B. *et al.* Comprehensive expression atlas of fibroblast growth factors and their receptors generated by a novel robotic in situ hybridization platform. *Dev. Dyn.* 234, 371–386 (2005).
120. *In Situ Hybridization Methods*. vol. 99 (Springer New York, 2015).
121. Kõressaar, T. *et al.* Primer3-masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 34, 1937–1938 (2018).
122. Saleem, K. S. K. & Logothetis, N. K. N. *A combined MRI and Histology Atlas of the rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, London (Elsevier, 2007).
123. CARSON, J. P., EICHELE, G. & CHIU, W. A method for automated detection of gene expression required for the establishment of a digital transcriptome-wide gene expression atlas. *J. Microsc.* 217, 275–281 (2005).
124. Speel, E. J. M., Hopman, A. H. N. & Komminoth, P. Amplification Methods to Increase the Sensitivity of In Situ Hybridization: Play CARD(S). *J. Histochem. Cytochem.* 47, 281–288 (1999).
125. Chao, J., DeBiasio, R., Zhu, Z., Giuliano, K. A. & Schmidt, B. F. Immunofluorescence signal amplification by the enzyme-catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). *Cytometry* 23, 48–53 (1996).
126. Bourne, R. & Bourne, R. ImageJ. *Fundam. Digit. Imaging Med.* 9, 185–188 (2010).

127. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
128. Carpenter, A. E. *et al.* CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 7, (2006).
129. Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M. & Carpenter, A. E. CellProfiler™: Free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques* 42, 71–75 (2007).
130. Shihavuddin, A. *et al.* Smooth 2D manifold extraction from 3D image stack. *Nat. Commun.* 8, 1–8 (2017).
131. Darbon, J., Cunha, A., Chan, T. F., Osher, S. & Jensen, G. J. Fast nonlocal filtering applied to electron cryomicroscopy. *2008 5th IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging Nano Macro Proc. ISBI* 1331–1334 (2008) doi:10.1109/ISBI.2008.4541250.
132. Buades, A., Coll, B. & Morel, J.-M. Non-Local Means Denoising. *Image Process. Line* 1, 208–212 (2011).
133. Legland, D., Arganda-Carreras, I. & Andrey, P. MorphoLibJ: Integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32, 3532–3534 (2016).
134. Soille, P. *Morphological Image Analysis*. (Springer Berlin Heidelberg, 1999). doi:10.1007/978-3-662-03939-7.
135. Agresti, A. *Analysis of Ordinal Categorical Data*. (John Wiley & Sons, Inc., 2010). doi:10.1002/9780470594001.
136. Kushary, D., Davison, A. C. & Hinkley, D. V. Bootstrap Methods and Their Application. *Technometrics* 42, 216 (2000).
137. Carpenter, J. & Bithell, J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat. Med.* 19, 1141–1164 (2000).
138. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Preprint at (2020).
139. Team, Rs. RStudio: Integrated Development Environment for R. (2020).
140. Wickham, H. *et al.* Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* 4, 1686 (2019).
141. Robin, X. *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 77 (2011).

142. Kita, Y. *et al.* Cellular-resolution gene expression profiling in the neonatal marmoset brain reveals dynamic species- And region-specific differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1–11 (2021).
143. Mastrella, G. *et al.* Targeting APLN/APLNR improves antiangiogenic efficiency and blunts proinvasive side effects of VEGFA/VEGFR2 blockade in glioblastoma. *Cancer Res.* 79, 2298–2313 (2019).
144. O’Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M. & Lolait, S. J. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Struct. Expr.* 1492, 72–80 (2000).
145. Spassky, N. Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *J. Neurosci.* 25, 10–18 (2005).
146. Young, C. C. *et al.* Ependymal ciliary dysfunction and reactive astrocytosis in a reorganized subventricular zone after stroke. *Cereb. Cortex* 23, 647–659 (2013).
147. Ayanlaja, A. A. *et al.* Distinct features of doublecortin as a marker of neuronal migration and its implications in cancer cell mobility. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–13 (2017).
148. Dulken, B. W., Leeman, D. S., Boutet, S. C., Hebestreit, K. & Brunet, A. Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep.* 18, 777–790 (2017).
149. Azim, K. *et al.* 3-Dimensional Examination of the Adult Mouse Subventricular Zone Reveals Lineage-Specific Microdomains. *PLoS ONE* 7, (2012).
150. Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B. & Raineteau, O. Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Dev. Camb.* 142, 2109–2120 (2015).
151. Falcão, A. M., Palha, J. A., Ferreira, A. C., Marques, F. & Sousa, N. Topographical Analysis of the Subependymal Zone Neurogenic Niche. *PLoS ONE* 7, 38647 (2012).
152. Azim, K. *et al.* Early Decline in Progenitor Diversity in the Marmoset Lateral Ventricle. *Cereb. Cortex* 23, 922–931 (2013).
153. Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Orend, G. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 4321–4327 (2016).

154. Tucić, M., Stamenković, V. & Andjus, P. The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–12 (2021).
155. Faissner, A., Roll, L. & Theodoridis, U. Tenascin-C in the matrixome of neural stem and progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 81, 22–31 (2017).
156. Kazanis, I., Belhadi, A., Faissner, A. & French-Constant, C. The Adult Mouse Subependymal Zone Regenerates Efficiently in the Absence of Tenascin-C. *J. Neurosci.* 27, 13991–13996 (2007).
157. Ma, Y. *et al.* Structural Basis for Apelin Control of the Human Apelin Receptor. *Structure* 25, 858–866.e4 (2017).
158. Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Bonner, T. I. & Davenport, A. P. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIV . Apelin Receptor Nomenclature , Distribution , Pharmacology , and Function. 62, 331–342 (2010).
159. Zhang, J. *et al.* Characterization of the Apelin/Elabela Receptors (APLNR) in Chickens, Turtles, and Zebrafish: Identification of a Novel Apelin-Specific Receptor in Teleosts. *Front. Endocrinol.* 9, (2018).
160. Pope, G. R., Roberts, E. M., Lolait, S. J. & O’Carroll, A. M. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: Species differences with rat. *Peptides* 33, 139–148 (2012).
161. Scott, I. C. *et al.* The G Protein-Coupled Receptor Agtr1b Regulates Early Development of Myocardial Progenitors. *Dev. Cell* 12, 403–413 (2007).
162. Tucker, B. *et al.* Zebrafish Angiotensin II Receptor-like 1a (agtr1a) is expressed in migrating hypoblast, vasculature, and in multiple embryonic epithelia. *Gene Expr. Patterns* 7, 258–265 (2007).
163. Hosoya, M. *et al.* Molecular and Functional Characteristics of APJ. *J. Biol. Chem.* 275, 21061–21067 (2000).
164. Chng, S. C., Ho, L., Tian, J. & Reversade, B. ELABELA: A hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev. Cell* 27, 672–680 (2013).
165. Pauli, A. *et al.* Toddler: An embryonic signal that promotes cell movement via apelin receptors. *Science* 343, (2014).

166. De Mota, N. *et al.* Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10464–10469 (2004).
167. Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M. & Llorens-Cortes, C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113, 653–662 (2002).
168. Reaux, A. *et al.* Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 77, 1085–1096 (2001).
169. Choe, W. *et al.* Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J. Neurovirol.* 6, (2000).
170. Puffer, B. A. *et al.* Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* 276, 435–444 (2000).
171. Medhurst, A. D. *et al.* Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* 84, 1162–1172 (2003).
172. O'Donnell, L. A. *et al.* Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J. Neurochem.* 102, 1905–1917 (2007).
173. Zeng, X. J., Yu, S. P., Zhang, L. & Wei, L. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp. Cell Res.* 316, 1773–1783 (2010).
174. Cheng, A. *et al.* Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev. Biol.* 272, 203–216 (2004).
175. Cx43 in neural progenitors.
176. Genet, N. *et al.* Connexin43-mediated neurovascular interactions regulate neurogenesis in the adult brain subventricular zone. *Cell Rep.* 42, 112371 (2023).
177. Malavasi, F. *et al.* Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiol. Rev.* 88, 841–886 (2008).
178. Guerreiro, S., Privat, A.-L., Bressac, L. & Toulorge, D. CD38 in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Cells* 9, 471 (2020).
179. Braidy, N. *et al.* Mapping NAD⁺ metabolism in the brain of ageing Wistar rats: potential targets for influencing brain senescence. *Biogerontology* 15, 177–198 (2014).

15. БЛАГОДАРНОСТИ

- Благодаря на моя научен ръководител **доц. Павлов** за подкрепата и насоките, които ми оказа, за безкрайните отговори на безкрайните ми въпроси.
- Благодаря на **проф. Тончев** за помощта, която ми оказа, за доверието и подкрепата! Благодаря за безкрайното търпение.
- На **Димо, Лора** и **Андон** за часовете обсъждане, спорене и приятелската атмосфера.
- Благодаря на лаборантите **Велина Кеновска, Елена Боева, Неранза Колева** и **Габриела Димитрова** за проявените отговорност и прецизност при изготвянето на хистологичните препарати.
- Благодаря на препараторите **Лилия Даскалова** и **Диляна Димитрова** за помощта, оказана при воденето на дирекционните упражнения.
- Благодаря на колегите от **Катедрата по анатомия и клетъчна биология** за прекрасната работна среда и морална подкрепа.
- Благодаря на колегите от административния отдел **Галина Ангелова** и **Ива Даскалова** за добрата организация и безпроблемното протичане на семестъра.
- Най-вече на голямото ми семейство за помощта, подкрепата, вярата в мен. Благодаря им, че бяха до мен дори и когато мен ме нямаше или тялом, или духом.