

Медицински Университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна  
Факултет по Медицина  
Катедра по Неврология

*д-р Надежда Бориславова Бонева-Борисова*

**Изследване експресията на свързващите мастни  
киселини протеини в условията на неврогенеза  
при примати**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

На дисертационен труд за присъждане на образователно-научна  
степен “доктор”

Шифър: 03.01.19 Неврология

**Научни ръководители:** *доц. д-р Антон Б. Тончев, дмн*  
*проф. д-р Надежда С. Делева, дм*

**Научен консултант:** *проф. д-р Тецумори Ямашима, дм*

**Рецензенти:** *проф. д-р Димитър М. Минчев, дмн*  
*проф. д-р Николай Ел. Лазаров, дмн*

**ВАРНА, 2012**

Дисертационният труд съдържа 135 страници и е онагледен с 41 фигури и 4 таблици. Литературната справка включва 242 заглавия, от които 10 са на кирилица, а 231 на латиница.

Изследванията са извършени в Катедрата по Неврохирургия към медицинския факултет на Университета на Каназава, гр. Каназава, Япония.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по Неврология при МУ „Проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна на 29.11.2011г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....2012г.  
от .....часа в .....

## Съдържание

|   |    |
|---|----|
| 1. Въведение  | 4  |
| 2. Цел и задачи   | 7  |
| 3. Материали и методи   | 8  |
| 3.1. Имуноблот  | 9  |
| 3.2. Имунофлуоресценция   | 12 |
| 3.3. Обработка на материала чрез специализирани софтуерни програми. Статистически методи. | 15 |
| 4. Резултати  | 17 |
| 4.1. Експресия на FABP 3, 5 и 7 в хипокампи   | 17 |
| 4.2. Експресия на FABP 3, 5 и 7 в малък мозък   | 23 |
| 5. Обсъждане  | 35 |
| 5.1. FABP в хипокампи   | 35 |
| 5.2. FABP в малък мозък   | 41 |
| 5.3. FABP в клиничната неврология   | 47 |
| 6. Заключение   | 50 |
| 7. Изводи   | 51 |
| 8. Справка за приносите на дисертационния труд  | 52 |
| 9. Публикации във връзка с дисертационния труд  | 53 |
| 10. Библиография  | 55 |
| 11. Благодарности   | 60 |

## 1. Въведение

Неврогенезата е динамичен процес на образуване на нови, функционално активни, неврони от прогениторни клетки и най-активно се извършва по време на ембриогенезата, а в по-малка степен и след раждането. Тези процеси се обозначават като ембрионална неврогенеза и неврогенеза при възрастни (адултна неврогенеза), респективно.

Концепцията за неврогенеза при възрастни е била непозната преди пионерските изследвания на Altman през 1962 г. Въпреки че откритието е било голямо научно постижение за времето си, то не получило признание от научната общност. Днес, 50 години по-късно, неврогенезата при възрастни е световно призната и е едно от най-интересните и вълнуващи полета на изследване в невронауката. Усилията на много изследователи, както и надеждите на много пациенти са насочени към възможностите за повлияване на невронални стволови клетки и тяхното приложение в лечението на първични заболявания и травми на мозъка.

При бозайници, включително и при хора, адултната неврогенеза е описана предимно в два мозъчни региона – субвентрикуларната зона (SVZ) на латералния вентрикул и субгрануларната зона (SGZ) на хипокампа (Eriksson et al., 1998; Tonchev et al., 2003). Тези зони, дефинирани като неврогенни ниши, представляват микросреда, която регулира поведението на стволовите клетки – съхранение, делене и диференциация (Morrison et al., 1997). Сред главните клетъчни компоненти на неврогенната ниша са астроцитите и ендотелните клетки. Балансираното взаимодействие между невроналната стволова клетка и неврогенната ниша се оказва критично за поддържане на хомеостазата в тази микросреда и нарушението на това взаимодействие би било пагубно за адултната неврогенеза (Suh et al., 2009). Затова всяка промяна в условията, които нормално съществуват в нишата, могат да благоприятстват или подтиснат неврогенезата.

Усилията на много учени в областта на невронауката са насочени към изясняване на условията, които стимулират процеса на диференциация на мозъчни стволови/прогениторни клетки към неврони. Известно е, че при условията на богата околна среда или повишена физическа активност, както и при някои заболявания, като епилепсия и церебрална исхемия, неврогенезата е увеличена (Nilsson et al., 1999; van Praag et al., 1999; Tonchev et al., 2003; Jessberger et al., 2007). Наскоро бе демонстрирано, както *in vitro*, така и *in vivo* при гризачи, че неврогенезата се стимулира, и при повишен прием на полиненаситени мастни киселини (ПНМК), като този ефект се свързва с повишени паметови функции (Beltz et al., 2007). Заради това интересът към тези мастни киселини, в частност докозахексаеновата (DHA) и арахидоновата (ARA), и тяхната значимост за функциите на мозъка, нарастна експоненциално през последните години. Въпреки интензивните проучвания, обаче, интимният механизъм на действие на ПНМК в мозъка остава неизяснен. ПНМК се свързват към малки (~15 kDa) цитоплазмени протеини – FABP (от англ. fatty acid-binding proteins). Тези протеини образуват семейство от 10 члена, като в мозъка се откриват три от тях: FABP3 (сърцев тип), FABP5 (кожен тип) и FABP7 (мозъчен тип). Те се характеризират с идентична третична структура, но с различен афинитет на свързване на мастни киселини. Така например, FABP3 свързва избирателно омега-6 ПНМК, FABP5 – наситени и ненаситени МК, а FABP7 – омега-3 ПНМК. В това отношение, ПНМК и FABP са функционално свързани, и осъзнаване ролята на FABP може да бъде ключът към изясняване механизма на действие на ПНМК в мозъка. От друга страна, наскоро бе открито (Briscoe et al., 2003), че ПНМК се свързват към мембранный G протеин-свързан рецептор GPR40 (G protein-coupled receptor 40), който се експресира в мозъка на примати (Ma et al., 2007a,b; Yamashima, 2008).

Хипокампът е основна цел в изследванията на адултната неврогенеза, защото при церебрална исхемия в него се индуцират противоположни процеси: невроналната смърт в *cornu Ammonis* (CA) 1 и адултната неврогенеза в SGZ (Tonchev et al., 2003). От друга страна, хипокампът е отговорен и за процеси като обучение и памет, от където се ражда и идеята, че адултната неврогенеза и паметта са взаимно свързани процеси. Малкият мозък от своя страна също има своите особености. При възрастни, церебелумът не е неврогенна зона, но е чувствителен на исхемия регион (Cervos-Navarro and Diemer, 1991). Много характерно за малкия мозък е, че образуването на зърнестите неврони започва в късния ембионален и продължава в ранния постнатален период (ten Donkelaar et al., 2003). Това се осъществява във външния грануларен слой (EGL, external granular layer) на малкомозъчната кора, който при хора постепенно изчезва до към края на първата година след раждането. Това прави ранния постнатален церебелум подходящ модел за изследване ролята на FABP в неврогенезата.

Докато експресията на FABP в мозък е проучена предимно при гризачи, то малко се знае за експресията на тези протеини в мозъка на маймуни и още по-малко на хора.

## 2. Цел и задачи

Целта на настоящата работа е да изследваме връзката между експресираните в мозъка FABP 3, 5 и 7 и неврогенезата при маймуни, като най-близките до човека примати. За целта използвахме модел на исхемия-индуцирана адултна неврогенеза в хипокамп на половозрели маймуни и постнатална неврогенеза в малък мозък на новородени маймуни. За изпълнението на целта, си поставихме следните задачи:

1. Да се определи наличието и общото ниво на експресия на FABP в хипокамп на половозрели маймуни.
2. Да се изследва наличието и времето на промяна на тяхната експресия след глобална исхемия на мозъка.
3. Да се определят видовете клетки, експресиращи FABP и да се сравни разпределението им в контролен и постисхемичен хипокамп.
4. Да се определи дали промяната в експресията на FABP в хипокамп се дължи на исхемията или на индуцираната неврогенеза, като се сравни протеиновото ниво и клетъчното разпределение на FABP в кора на постисхемичен и постнатален малък мозък.
5. Да се сравнят получените резултати с тези при гризачи.

### 3. Материали и методи

Всички експериментални процедури бяха проверени и одобрени от Комисията по Етика към Университета на Каназава, гр. Каназава, Япония, и съгласно Правилника на National Institutes of Health, САЩ за грижа и употреба на лабораторни животни (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). В експериментите бяха използвани 25 половозрели, 6-8 годишни и три постнатални, на възраст 13 и 53 дни след раждане (P13 и P53), и на една година японски маймуни (Japanese monkeys, *Macaca fuscata*). Макаките спадат към т. нар. маймуни на Стария свят (Old World Monkeys) и еволюционно, заедно с шимпанзето, орангутана, горилата и гибона са най-близките до човека примати.

Половозрелите животни бяха разделени в две групи – контролна и исхемична. Общо 6 маймуни от контролната група бяха подложени на “лъжлива” операция (sham operation), и 19 от исхемичната група – на глобална транзиторна мозъчна исхемия. Постнаталните маймуни не бяха оперирани. Глобалната мозъчна исхемия бе предизвикана чрез реверзибилно прекъсване на притока на кръв към мозъка. Тази процедура, извършена на *Macaca fuscata*, е описана за първи път от Yamashima et al. (1996). Операциите бяха извършени под обща инхалационна анестезия, при мониториране на пулс и зеници, венозна инфузия на Рингеров разтвор, и при напълно стерилни условия. Чрез срединен разрез беше отворена гръдната клетка на нивото на 2-3 интеркостално пространство. Подлежащите медиастинални тъкани бяха внимателно отпрепарирани, без да се нарушава целостта на плеврата. С метални щипки (клипс) бяха притиснати а. subclavia sinistra и truncus brachiocephalicus за 20 минути като ефективността на притискането бе демонстрирано чрез измерване на мозъчния кръвоток с лазерен Доплер (Vasamedics, St. Paul, Minnesota, САЩ). Още със спирането на мозъчния кръвоток се наблюдаваше



дилатация на зениците и липса на реакция на светлина, а скоро след това и спиране на спонтанното дишане, при което маймуните бяха апаратно обдишвани. След изтичане на 20те минути, мозъчният кръвоток беше възстановен чрез премахване на щипките, а гръдната клетка - затворена. Скоро след това се възстанови и спонтанното дишане и зениците се свиха. След излизане от анестезията, маймуните бяха върнати в клетките им. При “лъжливите” операции бе извършено отваряне на гръдния кош без притискане на артериите, т.е. без да се предизвиква мозъчна исхемия.

Всяка постанатална маймуна беше двукратно инжектирана с екзогенния маркер за клетъчна пролиферация 5-бромо-2'-деоксиуридин (BrdU, 250 mg/kg) – първи и 13 ден за P13 маймуна, и в два последователни дни преди евтаназирането за останалите две постнатални маймуни. Полово зрелите маймуни също бяха инжектирани с BrdU (100 mg/kg) в продължение на пет последователни дни и евтаназирани 2 часа след последната инжекция. Инжекционният разтвор беше приготвен непосредствено преди употреба при стерилни условия. BrdU (Sigma Chemicals, St.Louis, MO, САЩ) беше разтворен във физиологичен разтвор (0.9% NaCl), съдържащ 0.007N NaOH и инжектиран бавно венозно.

### *3.1. Имуноблот*

За количествен анализ на FABP протеините в SGZ на хипокамп и в малкомозъчна кора на възрастни маймуни, беше използван имуноблот (Western blot, WB) метода. Това е аналитичен метод за намиране на определени протеини в дадена проба от хомогенизирана тъкан или екстракт. Методът използва електорофореза в гел за сепариране на протеини в зависимост от дължината на полипептидната верига.

Под обща анестезия, маймуните бяха евтаназирани чрез интракардиална перфузия с 1 L студен физиологичен разтвор. Перфузията бе осъществена през канюла поставена в лявата камера и в същото време

дясното предсърдие бе перфорирано за ексангвинация. След това, бе извършена краниотомия и целият мозък бе бързо изваден от черепната кухина. Мозъчните структури, обект на нашето изследване, бяха дисецирани под микроскоп, замразени в течен азот и съхранени при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Бяха консервирани и части от лявата камера на сърцето и блокчета от кожа, които бяха използвани като позитивни контроли съответно за FABP3 (сърцев тип) и FABP5 (кожен тип). Екстракция на протеините от маймунски мозък беше извършена чрез хомогенизиране на тъканите с ултразвук в RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) буфер (Sigma-Aldrich, Токуо, Япония), съдържащ протеазо-инхибиторен коктейл (Sigma-Aldrich). След допълнително инкубиране на хомогенатите за 45 минути на лед, пробите бяха центрофугирани при скорост  $14\ 000 \times g$  за 20 минути при температура  $4^{\circ}\text{C}$ . След това супернатантата беше отделена и концентрацията на общия протеин беше определена по метода на Bradford с прясно приготвени стандарти. Непосредствено преди електрофорезата, пробите бяха разредени 1:1 с SDS (sodium dodecyl sulfate, New England Biolabs, Beverly, MA, САЩ) за денатурация на белтъците и нагreti за 5 минути при  $100^{\circ}\text{C}$ . Тъй като молекулното тегло на FABP протеините е малко ( $\sim 15$  kDa), електрофорезата беше проведена при висока концентрация акриламидовия гел - 20% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Във всяко гнездо на гела беше поставено  $40\ \mu\text{g}$  общ протеин от съответната проба мозъчна тъкан. В първата и последна ямка бяха поставени маркери, чиито протеинови ивици са с известно молекулно тегло. След електрофоретичното сепариране получените протеинови ивици (bands) бяха прехвърлени от гела върху PVDF (polyvinylidene fluoride) мембрана (ATTO, Токуо, Япония). За блокиране на неспецифичните (незаети) места за свързване на антигени върху мембраната, последната беше потопена в разтвор на 5% сухо мляко в TBS (tris buffered saline, pH 7.4) с разтворен в него 0.1% Triton X-100

(TBS-T) за 30 минути на стайна температура. Съответното първично анти тяло (Таблица 3.1) беше разрежено в 5% сухо мляко в TBS-T и инкубирано върху мембраната за през нощта при 4°C. На следващия ден, излишъкът от анти тяло беше отстранено чрез трикратно промиване на мембраната с TBS-T. Впоследствие, мембраната беше инкубирана в разтвор на съответното вторично анти тяло, конюгирано с ензим (horseradish пероксидаза) и насочено към вида на респективното първично анти тяло, за 1 час на стайна температура. След това мембраната беше трикратно измита. За визуализиране на имунореактивните ивици беше използван enhanced chemiluminescence detection kit (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Резултатите бяха проявени на тъмно върху филм (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Limited, UK).

| Първични анти теля | Разреждане | Вид, изотип | Маркер за (доставчик)                               |
|--------------------|------------|-------------|---|
| FABP3              | 1:600      | овчи        | Сърцев тип FABP (R&D Systems, Minneapolis, MN, САЩ) |
| FABP5              | 1:600      | кози        | Кожен тип FABP (R&D Systems)                        |
| FABP7              | 1:600      | кози        | Мозъчен тип FABP (R&D Systems)                      |
| $\beta$ -actin     | 1:10 000   | миши        | Вътрешна контрола (Sigma- Aldrich)                  |

**Таблица 3. 1.** Списък на първичните анти теля, тяхната употреба и вид, използвани в Western blot. FABP, Fatty Acid-Binding Protein.

За да демонстрираме, че във всяко гнездо на гела е поставено равно количество общ протеин, използвахме анти тяло срещу протеина на  $\beta$ -actin. Това е протеин, който се открива във всички клетки в приблизително еднаква концентрация и за това намира широко приложение като вътрешна контрола за количеството протеин, поставено в гнездата на гела. В нашият експеримент всяка от мембраните беше ре-блотирана с  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich). Това е възможно след осъществяване на т.нар. стрипинг на мембраната, при който се отстраняват вече използваните анти теля без това

да се отразява на сепарираните протеини върху мембраната. Постига се чрез промиване на мембраната в разтвор на Re-blot Plus (Chemicon) разреден 1:10 с дестилирана вода, за 20 минути на стайна температура. След кратко промиване с TBS-T, ре-блотирането продължава с блокираща стъпка.

### *3.2. Имунофлуоресценция*

След евтаназията, маймуните бяха перфузирани интракардиално с 0.5 L студен физиологичен разтвор, последван от 2.5 L студен разтвор на параформалдехид (4%) в 0.1 M фосфатен натриево-хлориден буфер (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4). Интракардиалната перфузия бе осъществена по описания вече начин. След фиксиращата перфузия, мозъкът бе изваден, нарязан на коронарни срези с дебелина 4-5 mm и постфиксиран в 4% параформалдехид. След това тъканите бяха криопротектирани в разтвор на 30% захароза, 0.01% натриев азид в PBS до потъването им на дъното на съда при температура 4°C. В последствие тъканните блокчета бяха потопени в среда за криосрези (Optimal Cutting Temperature, OCT medium, Tissue-Tek, Sakura Finetech Co, Токуо, Япония) за 3 дни и замразени на -20°C за през нощта. Тъканните блокчета бяха нарязани на коронарни криосрези с дебелина 40 µm на замразяващ микротом - Leica CM3050 (Leica, Germany). Срезите бяха съхранени при температура -20°C в криопротективен буфер, съдържащ 25% глицерол и 25% етилен гликол (Wako, Токуо, Япония) във фосфатен буфер.

За морфологичен анализ на експресията на FABP протеините, ние използвахме индиректна имунофлуоресценция. Методът позволява разкриването на 2 или 3 антигена на един и същи срез чрез двойна, респ. тройна имунофлуоресценция. За да няма кръстосана реакция между антителата, които се инкубираха едновременно, първичните антитела (Таблица 3.2) бяха подбрани така, че да са произведени в различни

животински видове (миши, кози, овчи, заешки или плъши). Вторичните антитела, които използвахме са насочени към вида на съответното първично антитяло и са конюгирани с флуорохроми Alexa Fluor 488, 546, 633 (Molecular Probes, Eugene, OR, САЩ), така че да излъчват светлина в различни спектри - в зеления, в червения и в инфрачервения спектър, респективно. Оцветяването беше извършено при свободно плуващи срези в кладенчетата на съд за клетъчни култури. Първоначално срезите бяха измити от криопротективният буфер чрез промиване в PBS и PBS-T. Неспецифичните места за свързване на антигени бяха блокирани чрез инкубиране на срезите в блокиращ разтвор на 5% нормален серум (конски или кози), 1% волски серумен албумин в PBS-T за 30 минути на стайна температура. Съответните първични антитела бяха разредени в разтвор на 5% нормален серум в PBS-T и инкубирани за 48 часа на 4°C. Несвързаните антитела бяха отстранени чрез промиване. Съответните вторични флуорохром-свързани антитела бяха инкубирани на тъмно за 2 часа на стайна температура. След ново измиване, срезите бяха монтирани върху предметни стъкла, включени във водоразтворима среда (Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA, САЩ), съдържаща запазващи флуоресценцията реагенти.

| Първични антитела | Разреж дане | Вид, изотип | Маркер за (източник)                               |
|-------------------|-------------|-------------|--|
| FABP3             | 1:50        | овчи        | Сърцев тип FABP (R&D Systems Minneapolis, MN, САЩ) |
| FABP5             | 1:50        | кози        | Кожен тип FABP (R&D Systems)                       |
| FABP7             | 1:100       | кози        | Мозъчен тип FABP (R&D Systems)                     |
| S-100 $\beta$     | 1:500       | миши        | Астроцити (Sigma-Aldrich)                          |
| GFAP              | 1:300       | заешки      | Астроцити (Sigma-Aldrich)                          |
|                   |             | миши        | Астроцити (DAKO, Carpinteria, CA, САЩ)             |
| Iba1              | 1:800       | заешки      | Микроглия/макрофаги (подарък от И.Имаи, Токио)     |
| Olig1             | 1:100       | заешки      | Астроцитни прекурсори, олигодендроцити             |

|                             |       |        |  |
|-----------------------------|-------|--------|--|
|                             |       |        | (Chemicon, Temecula, CA, САЩ)                              |
| NeuN                        | 1:100 | миши   | Неврони (Chemicon)   |
| Calbindin D28K              | 1:300 | миши   | Пуркиние клетки (Sigma)                                    |
| Parvalbumin                 | 1:500 | миши   | Пуркиние клетки, интерневрони (Sigma)                      |
| GAT1                        | 1:50  | заешки | Кошчеви интерневрони (Chemicon)                            |
| Рах6                        | 1:200 | заешки | Невронални прекурсори (Covance, Denver, Pennsylvania, САЩ) |
| Рах2                        | 1:100 | заешки | Прекурсори на интерневрони (Covance)                       |
| $\beta$ -Tubulin, class III | 1:300 | заешки | Невронални прекурсори (Sigma)                              |
| PSA-NCAM                    | 1:500 | миши   | Невронални прекурсори (подарък от Т. Секи, Токио)          |
| Nestin                      | 1:400 | заешки | Мозъчни прекурсори, астроцити (Chemicon)                   |
| BrdU                        | 1:100 | миши   | Синтез на ДНК (Becton Dickinson, San Jose, CA, САЩ)        |
|                             | 1:100 | плъши  | Синтез на ДНК (Harlan Sera-Lab, Loughborough, UK)          |
| Caspase-3                   | 1:50  | заешки | Апоптоза (Chemicon)  |

**Таблица 3.2.** Списък на първичните антитела, тяхното разреждане, вид и таргетни клетки, използвани във флуоресцентната имунохистохимия. FABP, fatty acid-binding protein; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; Iba1, Ionized calcium binding adapter molecule 1; Olig 1, oligodendrocyte lineage 1; NeuN, Neuronal nuclei; GAT1,  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter 1; PSA-NCAM, Polysialylated neural cell-adhesion molecule; BrdU, Bromodeoxyuridine.

Тъй като BrdU се включва във веригата на ДНК при нейното новосинтезиране, то за разкриването на този екзогенен антиген е необходима денатурация на двуверижната ДНК. Това бе осъществено в две стъпки. Първоначално нагряване на срезите на 65°C за 2 часа в разтвор на формамид/2%SSC (standard sodium citrate, стандартен натриев цитрат) и последвано от инкубация в 2N HCl за 30 минути на 37°C (Tonchev et al., 2003 a,b). След това първоначално третиране на срезите, оцветяването продължи с описаните по-горе стъпки на имунофлуоресценцията.

За да изключим неспецифична имунофлуоресценция, ние направихме негативни контролни оцветявания. Срезите бяха оцветени по описаният по-горе протокол, като стъпката с инкубация на първичното антитяло беше пропусната.

За откриването на дегенериращи неврони използвахме оцветяване с Fluoro-Jade B (Schmued and Hopkins, 2000). Оцветяването беше проведено на замразени срези, които първоначално бяха монтирани на предметни стъкла и изсушени на стайна температура. След това стъклата бяха последователно потопени в 100%, 70% и 50% етанол, по 3 минути във всеки разтвор. След изплакване в дестилирана вода, стъклата бяха преместени в разтвор на 0.06% калиев перманганат за 15 минути на стайна температура. След ново изплакване в дестилирана вода, срезите бяха оцветени в прясно приготвен разтвор на 0.001% Fluoro-Jade B (Chemicon) в 0.1% оцетна киселина за 30 минути. Накрая, срезите бяха измити, изсушени, потопени в ксилен за около минута и покрити с изкуствена смола. За визуализирането на оцветяването използвахме FITC филтър, а полученият сигнал беше в зелен цвят.

### *3.3. Обработка на материала чрез специализирани софтуерни програми. Статистически методи.*

Резултатите от имуноблота бяха проявени на филм и чрез сканиране бяха преобразувани в компютърен образ. Площта на протеиновите ивици реактивни за съответния тип FABP, беше измерена чрез софтуера ImageJ (НИН, Bethesda, Maryland, САЩ; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) и съотнесена към тази на ивицата за вътрешна контрола (FABP/  $\beta$ -actin). Статистическата значимост на така получените резултати беше проверена с еднофакторен анализ на вариациите (one way ANOVA), последван от теста на Tukey-Kramer (Tukey-Kramer's post hoc) за резултатите от хипокампа или теста на Dunnett (Dunnett's post hoc) за тези в малък мозък. Разликите от всички статистически анализи бяха считани за сигнификантни при  $P < 0.05$ .

Имунофлуоресцентните оцветяванията бяха наблюдавани с лазерен сканиращ конфокален микроскоп (LSM 510, Carl Zeiss Co, Токуо, Япония), а резултатите представени в компютърен образ. Срезите бяха сканирани

като използвахме multitrack mode, при който всеки канал се сканира отделно и независимо от другите. Това е необходимо, за да се избегне смесването на сигнали от различните канали при двойно или тройно оцветените срези. При така зададените функции, каналите бяха настроени както следва: Alexa Fluor 488 - към зеления, Alexa Fluor 546 – към червения, а Alexa Fluor 633 – към синия канал. Представителните образи бяха включени във фигури чрез Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, САЩ).

В единично оцветените срези, FABP позитивните клетки бяха изброени в 5 случайно избрани полета с размери 153 x 153  $\mu\text{m}$ . Двойните оцветявания бяха анализирани в случайно избрани полета с размери 230 x 230  $\mu\text{m}$ . Двойно позитивните клетки бяха оценени сред най-малко 100 FABP-експресиращи клетки в SGZ. Определихме SGZ като ивица с ширина 100  $\mu\text{m}$ , разположена между GD и CA4, под най-вътрешният ред клетки на зърнестия слой. Статистиката беше извършена със student T-test за сравнение между две групи.

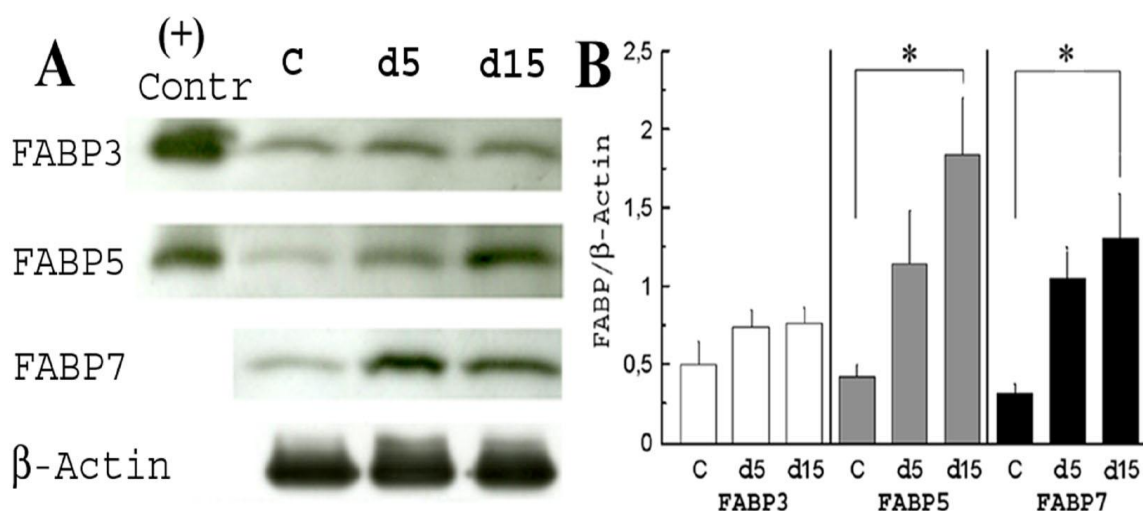
В малкия мозък, двойно позитивните за FABP5 и даден маркер клетки бяха изброени в случайно избрани полета с дължина на слоя на клетките на Пуркиние 1 mm. Общата дължина на всички изброени полета беше 20 mm (Yamashita et al., 2006). Резултатите са показани като процент от всички изброени FABP5 позитивни клетки.



## 4. Резултати

### 4.1. Експресия на FABP 3, 5 и 7 в хипокамп

Имуноблотът беше извършен, за да проверим протеиновото ниво на експресия на FABP 3, 5 и 7 в неисхемичен (контролен, C) и исхемичен хипокамп (Фиг. 4.1.1), като използвахме тъкани, взети на различни дни след исхемията – през първата седмица на ден 5 (d5) и в края на втората седмица на ден 15 (d15).



**Фигура 4.1.1.** Резултати от имуноблот на FABP 3, 5 и 7 в неисхемичен (C) и постисхемичен (d5 и d15) хипокамп. (A) Трите типа FABP се експресират в неисхемичен хипокамп и показват увеличение след исхемия. Като положителна контрола (+ Contr) за FABP3 се използва тъкан от сърце, а за FABP5 – от кожа. (B) Статистически анализ на FABP/ $\beta$ -actin разкрива значително увеличение експресията на FABP 5 и 7, но не и на FABP3, на ден 15 след исхемията. \*  $P < 0.05$ ; d5, ден 5 след исхемия; d15, ден 15 след исхемия. Използването на вътрешна контрола ( $\beta$ -actin) демонстрира, че във всяко гнездо на гела е поставено равно количество общ протеин.

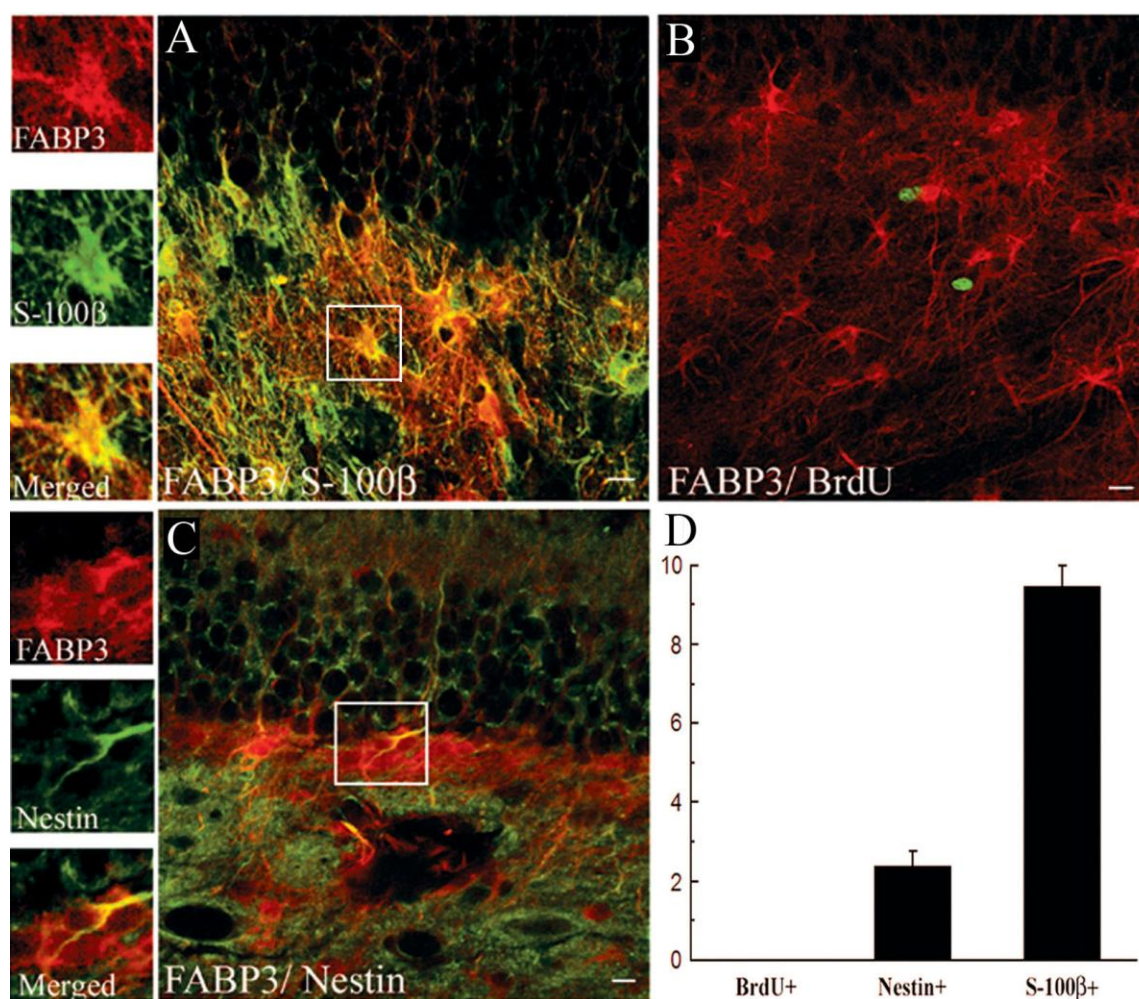
Като положителна контрола за FABP3 (сърцев тип), използвахме част от лявата камера на маймунско сърце, а за FABP5 (кожен тип) - част от кожа. FABP7 като мозъчен тип, се експресира избирателно в мозък и затова не използвахме допълнителна контрола. Резултатите от имуноблота показват, че всяко едно от антителата разпознава една единствена ивица протеин, която съответства на ивицата позитивна контрола и е с молекулно

тегло около 15 kDa (Фиг. 4.1.1А). Трите типа FABP показват имунореактивност с контролната неисхемична тъкан. След исхемия, обаче, FABP 5 и 7 показват увеличение в експресията, което е значимо на d15 в сравнение с контролата (Фиг. 4.1.1В). Експресията на FABP3 не показва сигнификантни промени след исхемия.

За да определим разпределението на клетките, експресиращи FABP в неврогенната ниша, направихме единични оцветявания за всеки от изследваните FABP в контролни и исхемични срези. Тъй като резултатите от имуноблота не показват значителна промяна на нито един от протеините на d5, този постисхемичен ден не се използва за имунофлуоресцентните оцветявания. В съответствие с резултатите от имуноблота, FABP3 показва експресия в SGZ на контролен и исхемичен хипокамп. Повечето FABP3-положителни клетки са разположени в SGZ и CA4 и не показват промяна в клетъчното разпределение след исхемия. Оцветяванията за FABP5 показват интересни резултати. В неисхемичен хипокамп, ние не откриваме експресия на FABP5 в нито един от слоевете му. На ден 15 след исхемията, обаче, експресията на FABP5 драстично се увеличава. Множество положителни клетки се откриват както в SGZ, така и в CA4, и по-малко в молекулярния слой. Това увеличение е значително и броят на позитивните за FABP5 клетки дори надвишава този на експресиращите FABP 3 и 7. В контролен хипокамп, FABP7 се открива в единични клетки в молекулярния слой и SGZ, а в CA4 се виждат множество FABP7-експресиращи нервни влакна. След исхемия на ден 15, обаче, клетките позитивни за FABP7 показват значителна концентрация в SGZ. В молекулярния слой все още се откриват позитивни клетки, а в CA4 – позитивни влакна. Преброяване броя на клетките, експресиращи FABP7 в SGZ показва, че техният брой сигнификантно се увеличава на ден 15 след исхемия в сравнение с контролата.

Определяне фенотипа на клетките, които експресират различните типове FABP, осъществихме чрез серии от двойни имунофлуоресцентни оцветявания. За целта използвахме следните маркери: S-100 $\beta$  и GFAP за астроцити, Iba1 за микроглия, nestin за прогениторни клетки, PSA-NCAM за новообразувани неврони,  $\beta$ III-tubulin за незрели неврони, NeuN за зрели неврони и BrdU за *de novo* образувани клетки.

**FABP3.** Двойни оцветявания за FABP3 и съответен маркер, показват ко-локализация на този протеин с маркерите за астроцити - S-100 $\beta$  (Фиг.



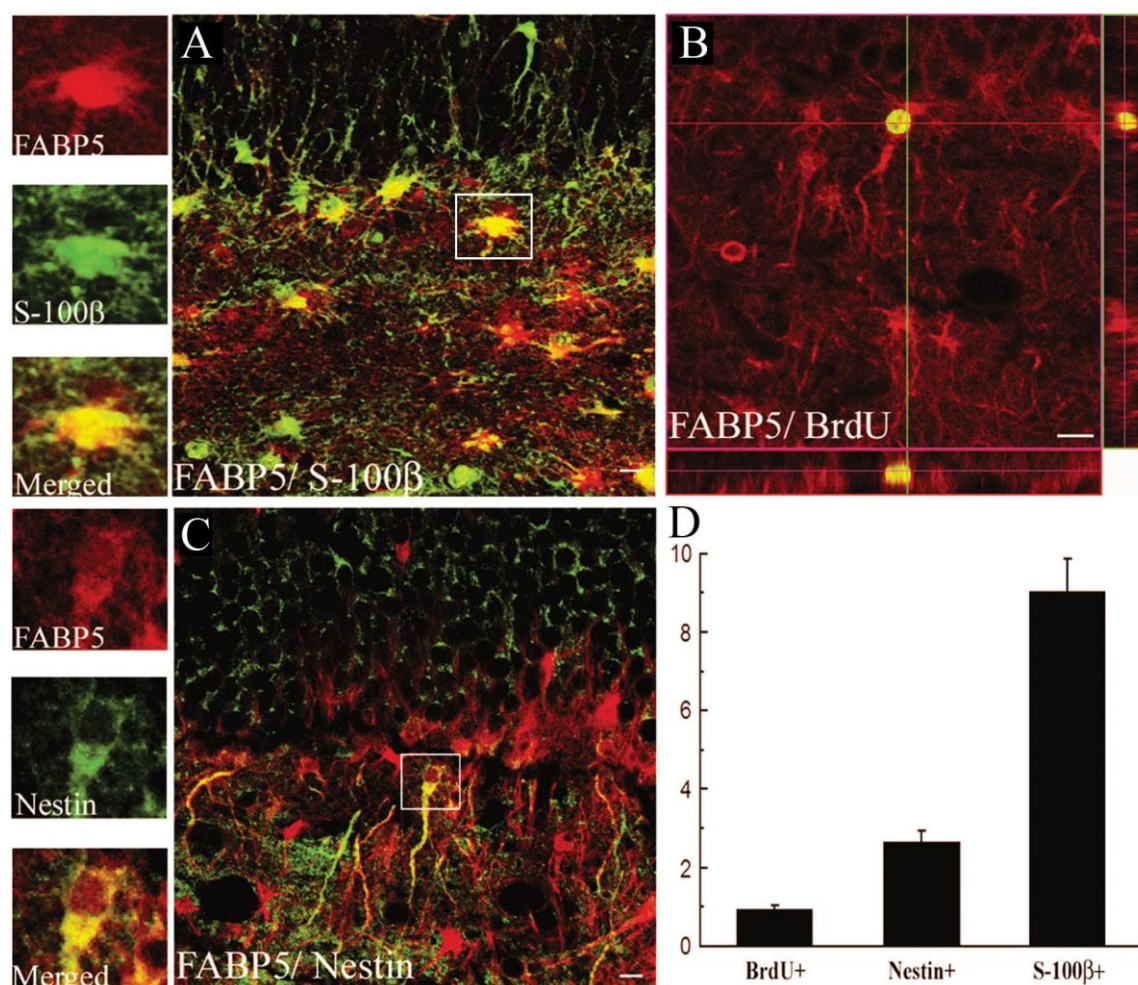
**Фигура 4.1.2.** Имунофенотипизиране на позитивните за FABP3 клетки в SGZ на ден 15 след исхемия. Двойни оцветявания за FABP3 (червено във всички снимки) и S-100 $\beta$ , маркер за астроцити (A, зелено); BrdU, маркер за пролифериращи клетки (B, зелено); и nestin, маркер за прогениторни клетки (C, зелено); FABP3 се ко-локализира само със S-100 $\beta$  (A, D) и nestin (C, D). Микрографиите представляват увеличен изглед на рамкираните региони в A и C. Мащабна линия = 10  $\mu$ m.

4.1.2A) и GFAP, както и с nestin, маркер за прогениторни клетки (Фиг. 4.1.2C). Клетките, експресиращи BrdU (Фиг. 4.1.2B), Iba1,  $\beta$ III-tubulin и PSA-NCAM са негативни за FABP3. Много от FABP3-позитивните клетки се откриват в близост до BrdU-експресиращите клетки (Фиг. 4.1.2B) или до  $\beta$ III-tubulin-позитивните незрели неврони. След исхемия, FABP3 се експресира предимно от астроцити и от nestin-позитивните прогениторни клетки (Фиг. 4.1.2D). За сравнение, FABP3-експресиращите клетки показват същият фенотип в контролен хипокамп, а именно, експресия в астроцити и прогениторни клетки. FABP3 не се експресира в зрели неврони, нито в контролен, нито в постисхемичен хипокамп.

**FABP5.** Подобно на FABP3, FABP5 също се експресира в астроцити, маркирани със S-100 $\beta$  (Фиг. 4.1.3A) и GFAP. За разлика от FABP3, обаче, FABP5 се ко-локализира и с BrdU (Фиг. 4.1.3B). Около 13% от клетките, експресиращи FABP5, са двойно позитивни за маркера за пролифериращи клетки BrdU. Тъй като след исхемия микроглията също пролиферира (Tonchev et al., 2003a), ние направихме двойно оцветяване за FABP5 и микроглиалния маркер Iba1 в SGZ. Резултатите показват липса на ко-локализация на двата маркера в SGZ, което предполага, че FABP5-позитивните пролифериращи клетки са вероятно вид прогенитори. Затова, ние извършихме комбинирано оцветяване на FABP5 и nestin, маркер за прогениторни клетки, при което се откриват множество двойно позитивни клетки в SGZ (Фиг. 4.1.3C), които бяха около 38% от FABP5-позитивните клетки. В рамките на допълнителни експерименти не се установи ко-експресия между FABP5 и маркери за новородени и незрели неврони (PSA-NCAM и  $\beta$ III-tubulin). Подобно на FABP3, след исхемия FABP5 се експресира главно от астроцити в SGZ, но за разлика от FABP3, се локализира и в пролифериращи, и прогениторни клетки (Фиг. 4.1.3D). Нито зрелите, нито младите неврони показват имунореактивност за FABP5. За разлика от SGZ, в CA1 региона на хипокампа ние наблюдаваме

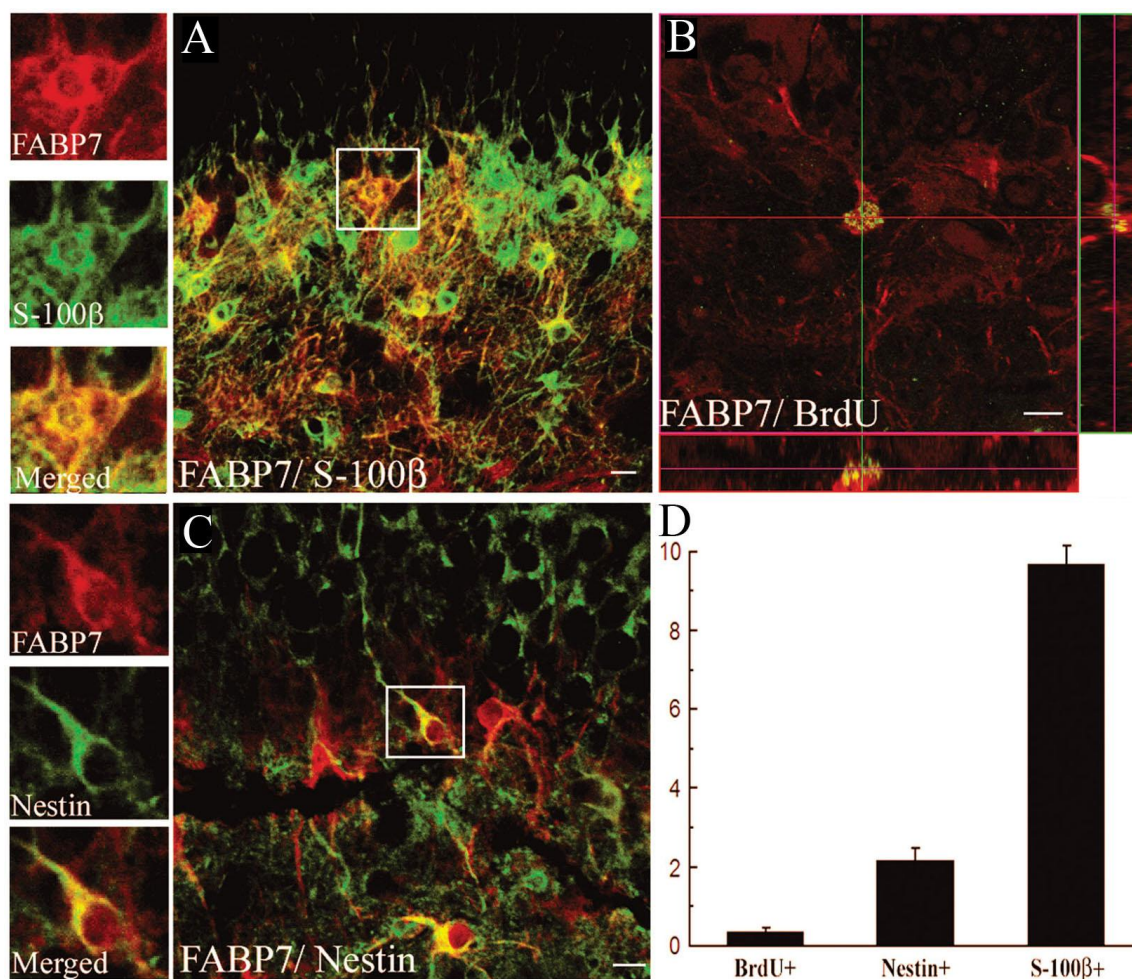


ко-експресия между FABP5 и Iba1 в голяма част от микроглиалните клетки 15 дни след исхемия.



**Фигура 4.1.3** Имунофенотипизиране на позитивните за FABP5 клетки в SGZ на ден 15 след исхемия. Двойни оцветявания за FABP5 (червено във всички снимки) и S-100β, маркер за астроцити (А, зелено); BrdU, маркер за пролифериращи клетки (В, зелено); nestin, маркер за прогениторни клетки (С, зелено). FABP5 се ко-локализира със S-100β (А, D), BrdU (В, D) и nestin (С, D). Микрографиите вляво представляват увеличен изглед на рамкираните региони в А и С. Машабна линия = 10 μm.

**FABP7.** Оцветените за FABP7 клетки в SGZ показват фенотип сходен с този на FABP5-позитивните клетки. Астроцити, маркирани със S-100β (Фиг. 4.1.4А) и GFAP, експресират FABP7. Клетките в SGZ, позитивни за BrdU, също експресират FABP7, на ден 15 след исхемията (Фиг. 4.1.4В). В сравнение с FABP5, обаче, процентът на ко-експресия е значително по-малък (~ 2%). Подобно на останалите два типа FABP, FABP7 не се открива



**Фигура 4.1.4.** Имунофенотипизиране на клетки, позитивни за FABP7 в SGZ, на ден 15 след исхемия. Двойни оцветявания за FABP7 (червен канал във всички микрографии) и S-100β, маркер за астроцити (A, зелено); BrdU, маркер за пролифериращи клетки (B, зелено) и nestin, маркер за прогениторни клетки (C, зелено). FABP7 се ко-локализира със S-100β (A, D), BrdU (B, D) и nestin (C, D). Уголемените образи вляво на A и C представляват увеличен изглед на рамкираните региони в A и C. Машабна линия = 10 μm.

в зрели и незрели неврони, а в клетки, съседни на новообразувани неврони. Микроглиалните клетки са негативни за FABP7. Въпреки че FABP7 се експресира само от астроцитите в неischemичен хипокамп, на ден 15 след исхемия, положителни за FABP7 са и nestin-експресиращите (Фиг. 4.1.4C) и пролифериращите клетки (Фиг. 4.1.4B).

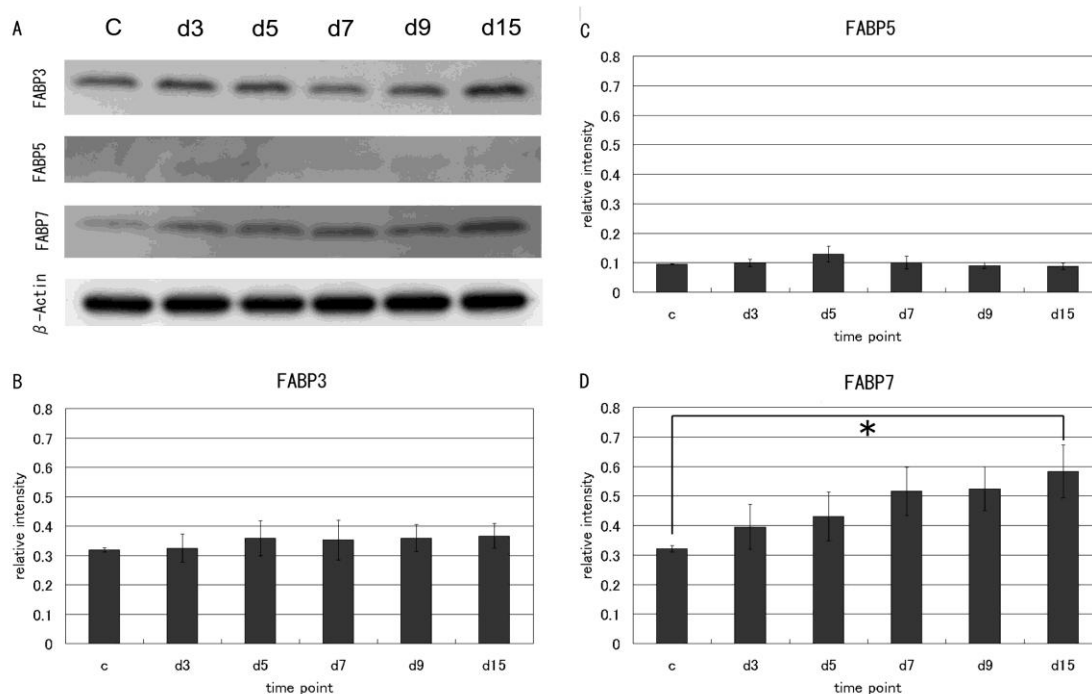
Обобщено, FABP3-позитивните клетки показват предимно астроцитен фенотип и само 30% от тях са типизирани като прогениторни

клетки. Около 90% от FABP5-позитивните клетки показват астроцитен фенотип, а 13% от тях са *de novo* образувани клетки, и приблизително 40% са прогенитори. От FABP7-експресиращите клетки едва 2% са новообразувани клетки, а останалите – астроцити. Прогениторните клетки, които експресират FABP7 са около 30%.

#### 4.2. Експресия на FABP 3, 5 и 7 в малък мозък

С имуноблот определихме базистната експресия на изследваните FABP в малък мозък на възрастни маймуни – контроли и постисхемични екземпляри. Малкият мозък не е бил обект на изследване в предишни експерименти в същия животински модел на глобална транзиторна мозъчна исхемия. Затова, като първи стъпки ние определихме наличие или липса на промяна в експресията на FABP 3, 5 и 7 след исхемия, на различни постисхемични периоди – ден (d) 3, 5, 7, 9 и 15. Антителата, които използвахме в експериментите с церебелума, са същите, които използвахме в предходните експерименти в хипокампа и чиято специфичност вече определихме. Затова положителните контроли в този имуноблот бяха пропуснати. Както и при хипокампа, всяко от антителата срещу FABP 3, 5 и 7 разпознава единична ивица протеин, около 15 kDa молекулна маса, отговаряща на големината на съответния FABP (Фиг. 4.2.1A). Статистическият анализ на резултатите показва, че: (1) FABP3 се експресира в неисхемична малкомозъчна кора на възрастни маймуни и след исхемия нивото на експресия леко, но незначимо се повишава (Фиг. 4.2.1B); (2) нивото на експресия на FABP5 е в едва доловими стойности, които не се променят след исхемия (Фиг. 4.2.1C); (3) FABP7 е наличен в контролен церебелум, а след исхемия постепенно се повишава и достига сигнификантни стойности на 15 ден, съотнесено към контролата (Фиг. 4.2.1D). Чрез конфокална микроскопия, ние изследвахме клетъчната локализация на трите типа FABP в малък мозък на постнатални и на

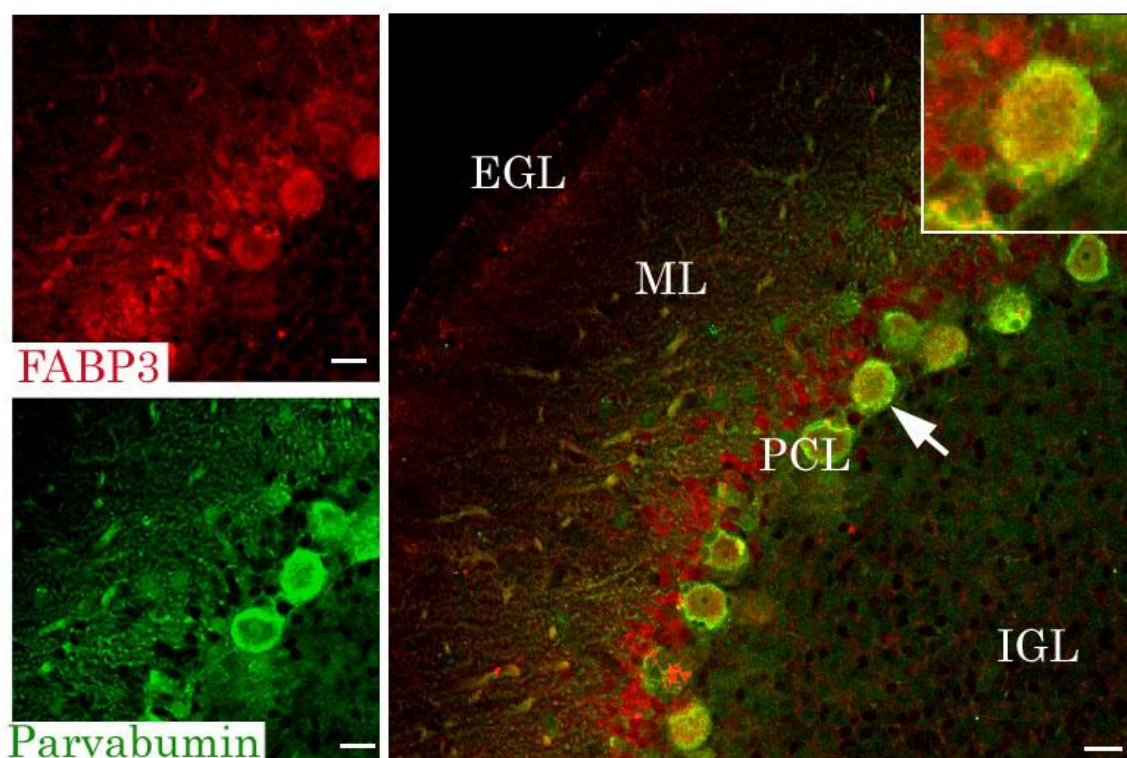
възрастни маймуни. Тъй като, резултатите от имуноблота показват значима промяна в експресията на FABP7 само на d15 след исхемия, ние се фокусирахме върху този постисхемичен период.



**Фигура 4.2.1.** (А) Имуноблот за FABP 3, 5 и 7 в малкомозъчна кора на възрастни маймуни – неисхемични (С) и постисхемични (d3, d5, d7, d9 и d15). (В) FABP3 се повишава леко и незначително след исхемия. (С) Експресията на FABP5 е на много ниски нива, както в контролите, така и след исхемия. (D) FABP7 се увеличава постепенно след исхемията, като на ден 15 повишението става статистически значимо в сравнение с контролните проби. \*P < 0.05.

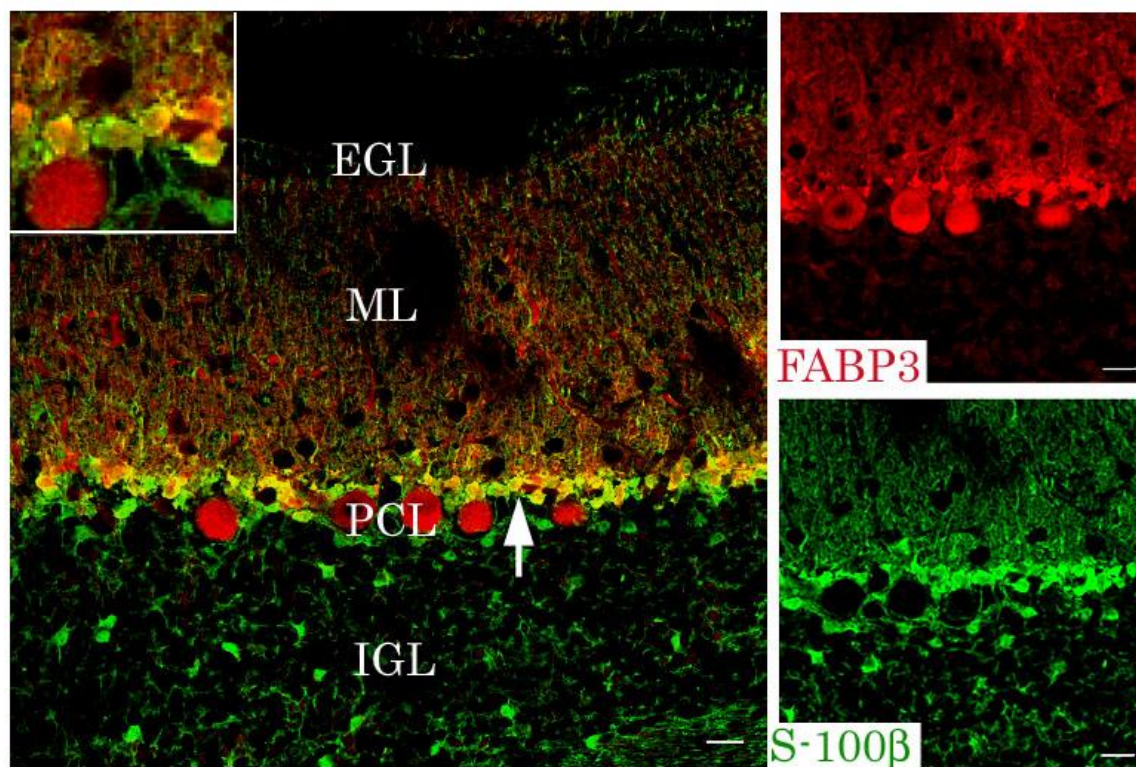
**FABP3.** Оцветяванията разкриват, че неговата експресия при възрастни и постнатални маймуни е идентична, както и че не се влияе от исхемия. Редица двойни оцветявания разкриват локализацията на FABP3 в клетки на Пуркиние (Фиг. 4.2.2, стрелка, увеличен образ) и в глиални клетки на Бергман (Фиг. 4.2.3, стрелка, увеличен образ). В молекулярния слой, FABP3 се установява в израстъци на глията на Бергман и дендрити на клетките на Пуркиние. В бялото вещество, някои астроцити показват имунореактивност за FABP3.





**Фигура 4.2.2.** Имунофлуоресценция, показваща експресията на FABP3 в постнатален церебелум. FABP3 се експресира в клетките на Пуркиние (стрелка, увеличен образ горе вдясно). Червеният и зеленият панели вляво представляват отделните канали на микрографията. Машабна линия = 20  $\mu\text{m}$ . EGL, външен грануларен слой; IGL, вътрешен грануларен слой; ML, молекулярен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

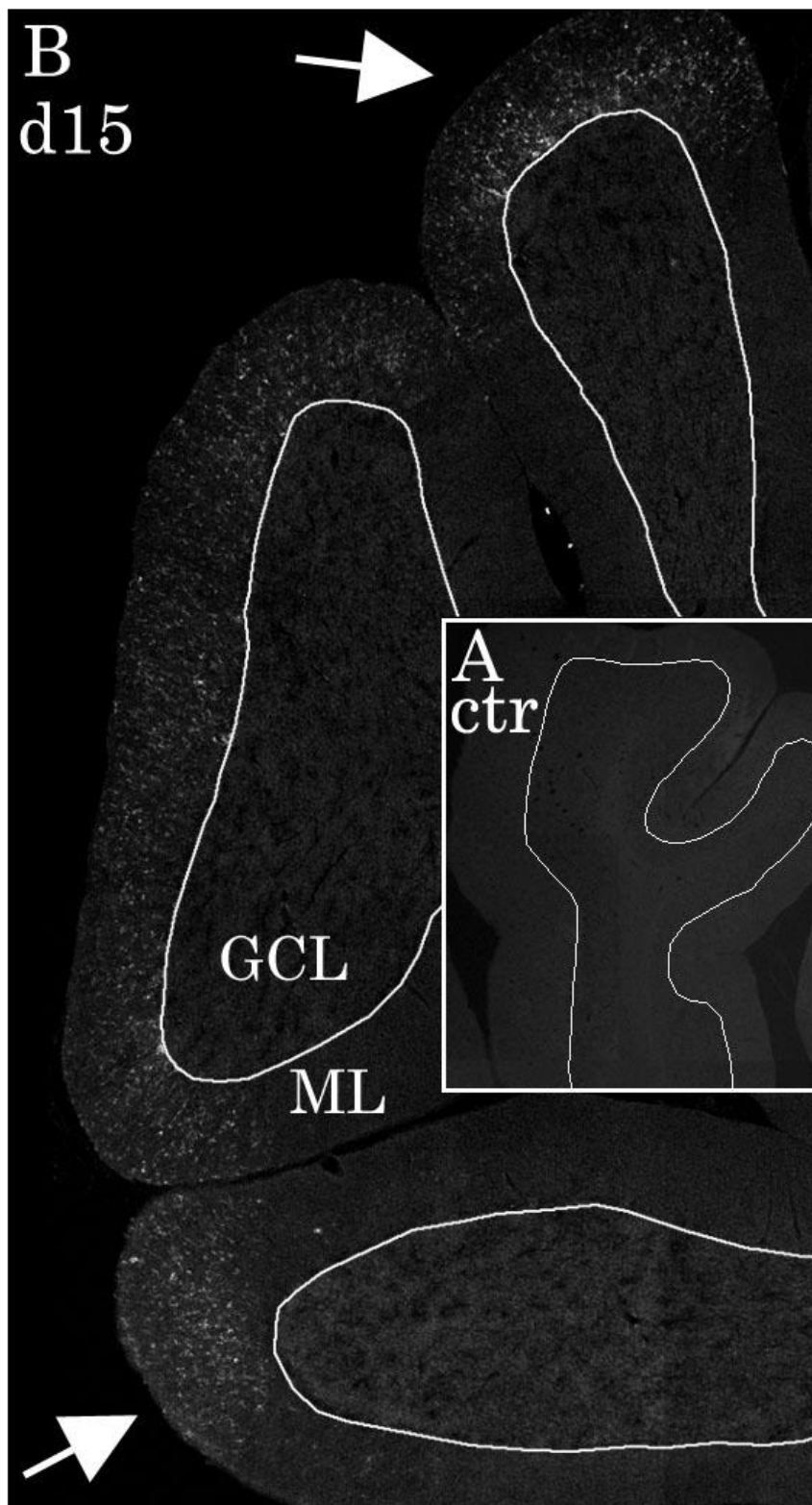
**FABP5.** Подобно на резултатите в контролен хипокамп на възрастни маймуни, ние не откриваме експресия на FABP5 в контролен малък мозък (Фиг. 4.2.4А). Оцветяванията на срези от исхемичен церебелум, обаче, разкриват наличието на клетки, позитивни за FABP5 (Фиг. 4.2.4В, стрелки). Характерно е, че тези клетки оформят добре отграничени зони, чието разпределение е неравномерно и предимно в латералните части на фолиите на малкия мозък. На голямо увеличение, тези FABP5 позитивни клетки имат морфологията на микроглия (Фиг. 4.2.5, стрелка, увеличен образ вляво). Разпределението им е предимно в молекулярния слой и не преминава дебелината на слоя на клетките на Пуркиние (Фиг. 4.2.5, червения панел). Изхождайки от морфологията на тези клетки, ние извършихме двойно оцветяване за FABP5 и маркера за микроглия Iba1



**Фигура 4.2.3.** Имунорфлуоресценция, показваща експресията на FABP3 в постнатален церебелум. FABP3 се експресира в глията на Бергман (стрелка, увеличен образ). Червеният и зеленият панели вдясно представляват отделни канали на микрографията. Машабна линия = 20  $\mu\text{m}$ . EGL, външен грануларен слой; IGL, вътрешен грануларен слой; ML, молекулярен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

(Фиг. 4.2.5). Получените резултати разкриват, че всички FABP5-експресиращи клетки са позитивни и за Iba1, но не всички Iba1-оцветени клетки експресират FABP5. Освен това, ние наблюдаваме струпвания от двойно позитивни клетки (FABP5<sup>+</sup>/ Iba1<sup>+</sup>), които наподобяват тела на неврони на Пуркиние и се откриват само в слоя на клетките на Пуркиние (Фиг 4.2.5, глава на стрелка, увеличение вдясно). Оцветяванията за FABP5 и за parvalbumin, маркер за клетки на Пуркиние, не показват наличие на двойно позитивни клетки. Нещо повече, ние не наблюдаваме parvalbumin имунореактивни клетки в зоните на FABP5 позитивна микроглия, докато съседните участъци показват нормалната цитоархитектоника на малкомозъчната кора. В други експерименти, ние оцветихме исхемичен малък мозък с маркер за апоптоза – caspase 3, за да проверим дали зоните с

експресия на FABP5 са зони, съдържащи загиващи след исхемията клетки (Фиг. 4.2.6). Оцветяването показва, че двете антитела се експресират в едни и същи участъци. При това, FABP5- позитивните клетки са

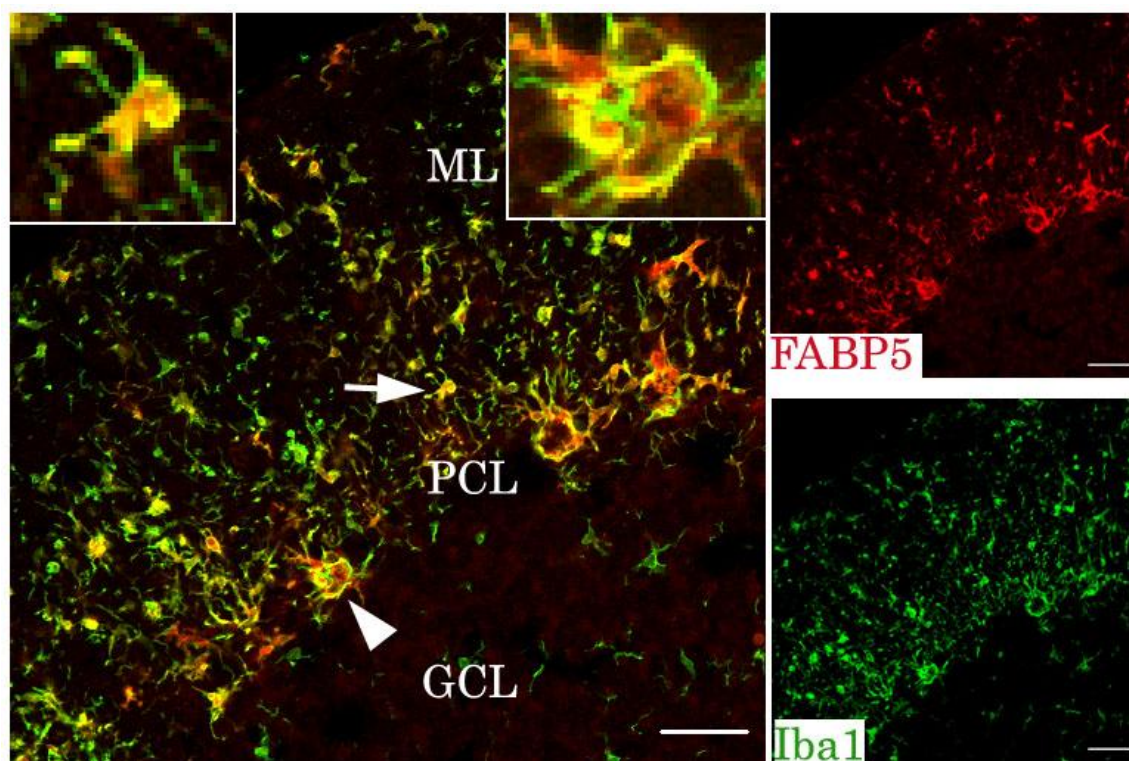


**Фигура 4.2.4.**

Имунофлуоресцент на микрография, показваща експресията на FABP5 в малък мозък на възрастни примати. (А) В контролен, неисхемичен (ctr), церебелум липсва експресия на FABP5. (В) След исхемия, обаче, в латералните части на церебеларните фолии се наблюдават множество FABP5 позитивни клетки (стрелки). ctr, контрола; d15, 15 ден след исхемия; GCL, грануларен слой; ML, молекулярен слой; бялата линия очертава слоя на клетките на Пуркиние.



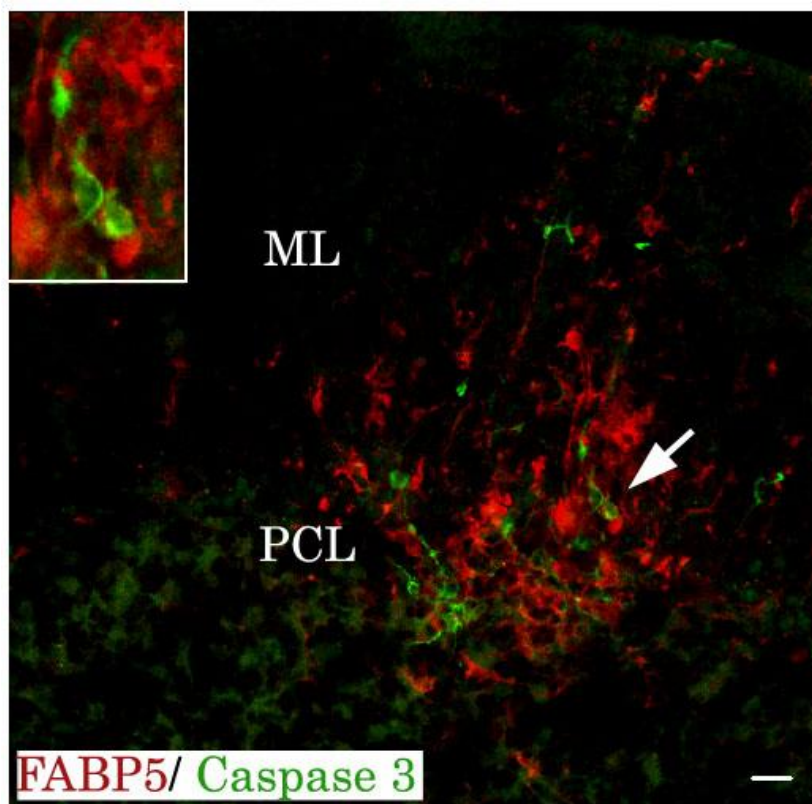
локализирани в съседство с caspase 3-експресиращите апоптични клетки (Фиг. 4.2.6).



**Фигура 4.2.5.** Двойно оцветяване за FABP5 (червено) и микроглиалния маркер Iba1 (зелено) в малък мозък на възрастна маймуна 15 дни след исхемия. Двойно позитивни клетки (жълто) се откриват в молекулярния слой (стрелка, увеличен образ вляво), а в слой на клетките на Пуркиние се наблюдават струпвания от двойно позитивни клетки, които наподобяват тялото на клетка на Пуркиние (глава на стрелка, увеличен образ вдясно). Мащабна линия = 20µm. GCL, грануларен слой; ML, молекуларен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

С цел по-детайлно изследване на невродегенерацията след исхемия, ние осъществихме оцветяване с Fluoro-Jade B, маркер, който селективно оцветява дегенериращи неврони. За целта използвахме срези от по-ранен постисхемичен период – ден 4. Оцветяването показва наличие на Fluoro-Jade-позитивни клетки в слоя на клетките на Пуркиние, които наподобяват тела на едноименните клетки. Оцветяванията на срези от малък мозък на постнатани маймуни показват следните резултати. Постнаталните екземпляри (P13 и P53) демонстрират умерена имунореактивност към

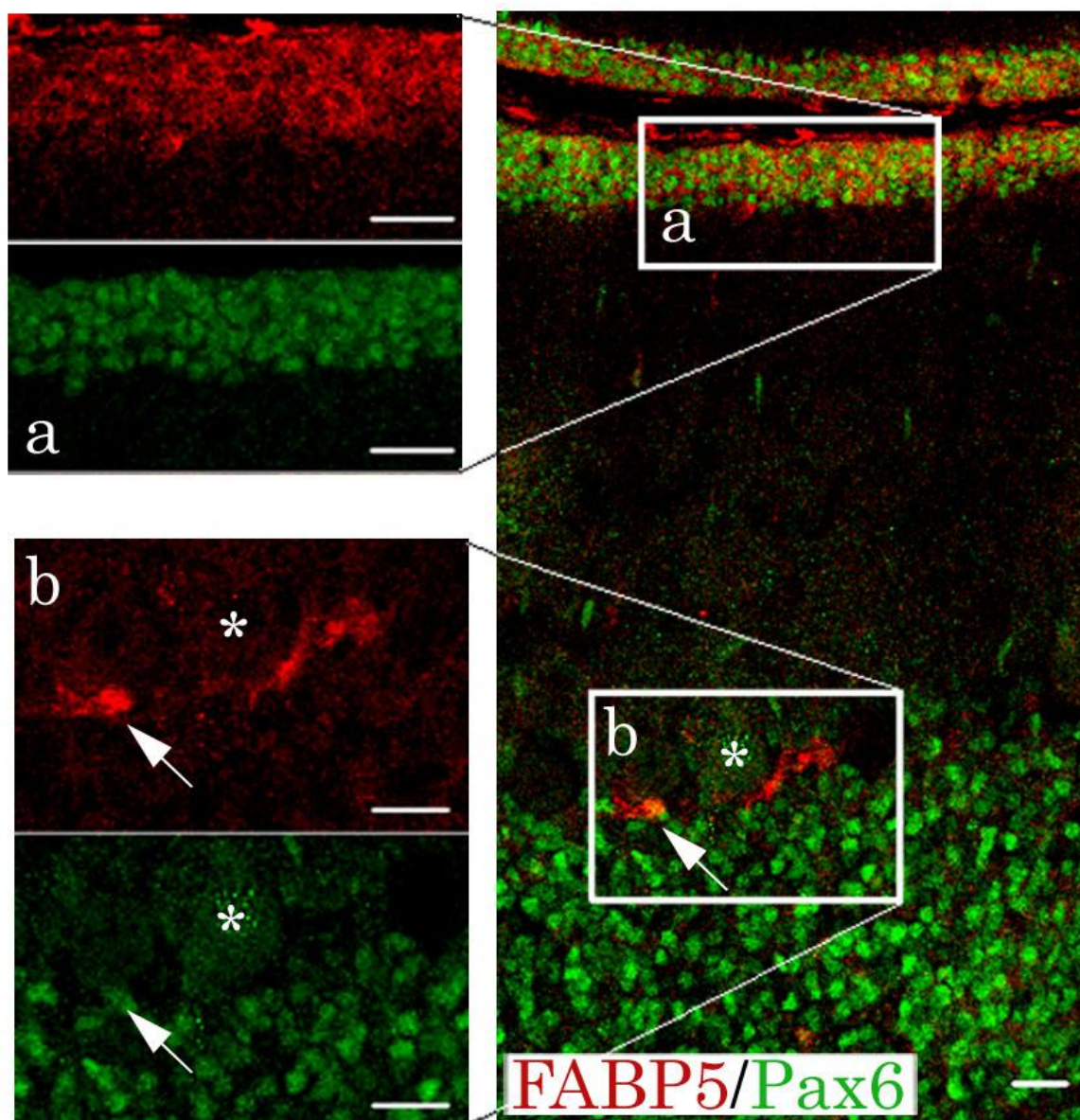
FABP5. В малкия мозък на едногодишна маймуна, обаче, не откриваме експресия на FABP5 – по подобие на възрастните маймуни. На този



**Фигура 4.2.6.** Двойно оцветяване за FABP5 (червено) и caspase 3 (зелено), маркер за апоптоза, в малък мозък, 15 дни след исхемия. FABP5-позитивните клетки са съседни на апоптичните клетки (стрелка, уголемен образ вляво). Мащабна линия = 20  $\mu$ m. ML, молекулярен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

времеви интервал външният гранулен слой от прогенитори вече е изчезнал. В ранния постнатален период, малкият мозък експресира транскрипционния фактор Pax6, чиято наличност маркира външния и вътрешния гранулен слой (Stoykova and Gruss, 1994). Двойно оцветяване за FABP5 и Pax6 (Фиг. 4.2.7) показва, че FABP5 интензивно оцветява външния (Фиг. 4.2.7A) и само отделни клетки във вътрешния гранулен слой (Фиг. 4.2.7B). Външният грануларен слой съдържа пролифериращи прогенитори, което се демонстрира с тройно оцветяване за Pax6, BrdU и GFAP. В допълнение, двойно оцветяване за FABP5 и BrdU, показва, че двете антитела се експресират съвместно в пролифериращите клетки във външния грануларен слой. Чрез допълнителни експерименти, ние фенотипизираме FABP5-имунореактивните клетки във вътрешния грануларен слой. Количествен анализ на клетки, двойно позитивни за Pax6





**Фигура 4.2.7.** Двойно оцветяване за FABP5 (червено) и транскрипционния фактор Pax6 (зелено) в малък мозък на постнатална (P13) маймуна. Ко-локализация на двата антигена във външния (a) и вътрешния (b) грануларен слой. Мащабна линия = 20  $\mu$ m. Звездичките маркират телата на клетките на Пуркиние.

и FABP5, показва, че такива клетки се локализират преференциално в слоя на клетките на Пуркиние и във вътрешния грануларен слой (Таблица 4.1.). Малка част (~ 2% от FABP-позитивните клетки) се откриват в молекулярния слой. За да определим дали Pax6<sup>+</sup>/FABP5<sup>+</sup> двойно-позитивните клетки са зърнести неврони, направихме двойно оцветяване за FABP5 и NeuN, маркер за зрели неврони (Фиг. 4.2.8).

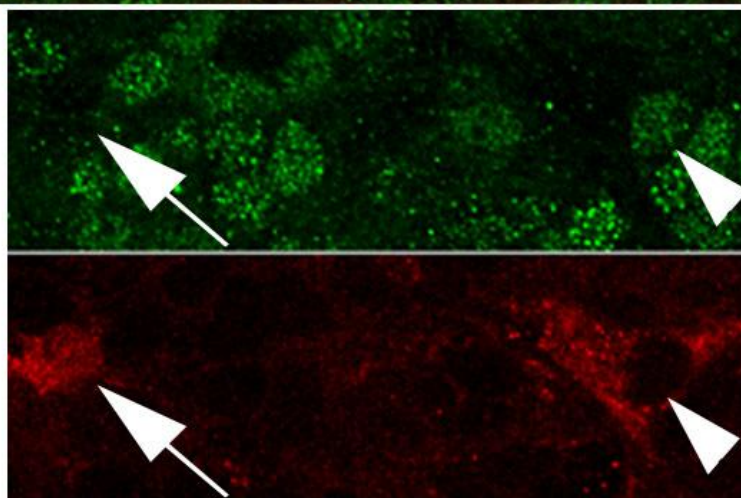
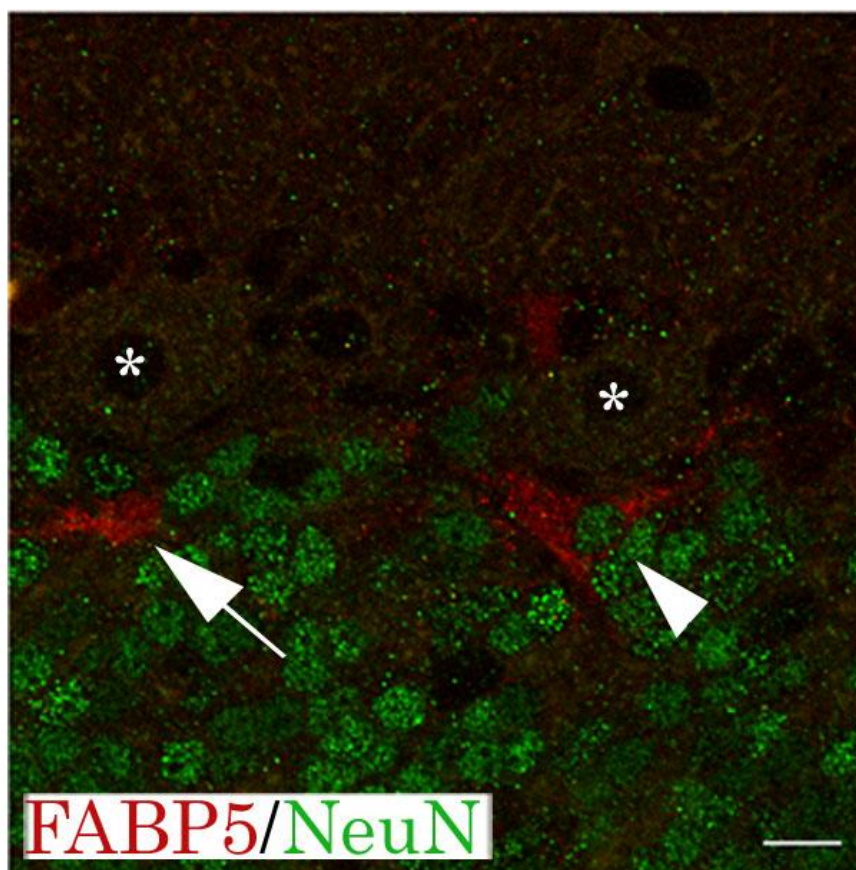
| <b>FABP5+/</b>                      | <b>Rax6</b> | <b>NeuN</b> | <b>Olig1</b> | <b>S-100β</b> |
|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| <b>Молекулярен слой</b>             | 2.26%       | -           | -            | -             |
| <b>Слой на клетките на Пуркиние</b> | 15.25%      | -           | 4.35%        | 3.7%          |
| <b>Вътрешен грануларен слой</b>     | 12.99%      | 15.46%      | 51.09%       | 55.55%        |
| <b>Бяло вещество</b>                | -           | -           | 8.7%         | 1.86%         |

**Таблица 4.1.** Процентно разпределение по слоеве на двойно-позитивните клетки за FABP5 и съответни клетъчни маркери в малкомозъчната кора на постнатални маймуни.

Морфологично, ние разграничаваме два вида клетки – (1) клетки, които са двойно-позитивни (Фиг. 4.2.8, глава на стрелка) и (2) клетки, които са FABP5-позитивни, но NeuN-негативни (FABP5<sup>+</sup>/NeuN<sup>-</sup>) (Фиг. 4.2.8, стрелка). Двойно позитивните клетки съставляват около 15% от всички FABP5-експресиращи клетки (Таблица 4.1.). Фенотипа на FABP5<sup>+</sup>/NeuN<sup>-</sup> клетки, ние определихме чрез поредица от допълнителни комбинирани оцветявания с: Rax2 - маркера за инхибиторни интерневрони на Голджи във вътрешния грануларен слой, S-100β, както и с Iba1. FABP5 се локализира само в S-100β имунореактивни клетки (Фиг. 4.2.9). Процентът на клетки, двойно-позитивни за FABP5 и S-100β, е най-голям във вътрешния грануларен слой и по-малък в слоя на Пуркиние и в бялото вещество (Таблица 4.1.). В развиващият се мозък, освен в астроцити, S-100β се експресира и в олигодендроцитни прогенитори (Nachem et al., 2005). По тази причина, извършихме оцветяване за FABP5 и Olig1. Olig1 е транскрипционен фактор, който се експресира в олигодендроцити и техни прогенитори по време на развитието на мозъка (Lu et al., 2000). Резултатите показват ко-локализация на двете антитела, като двойно-оцветени клетки се наблюдават предимно във вътрешния грануларен слой и в по-малка степен в слоя на клетките на Пуркиние или в бялото вещество

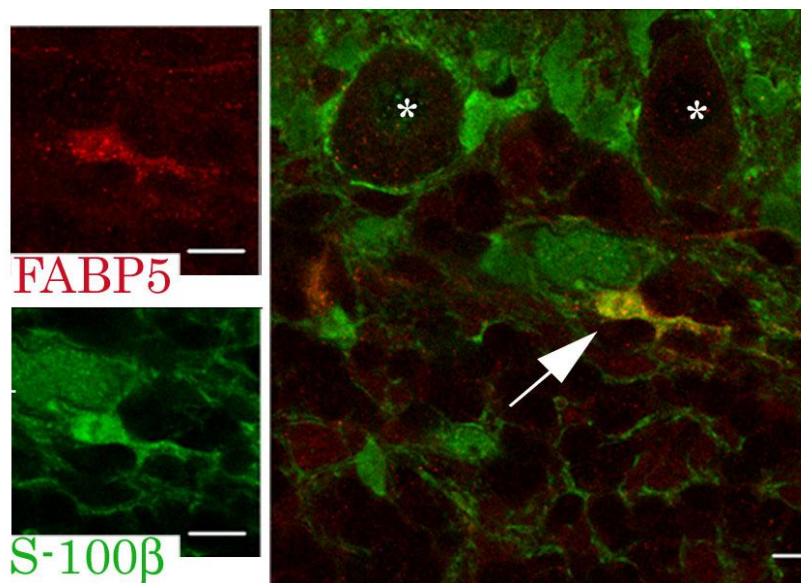
на малкия мозък (Таблица 4.1.) Olig1 не показва ко-експресия с NeuN, но има такава със S-100 $\beta$ .

**FABP7.** За разлика от FABP5, FABP7 се открива в малкия мозък както на възрастни, така и на постнатални маймуни. FABP7 показва сходна експресия в зрял и развиващ се церебелум, но и някои съществени различия. И в двете групи FABP7 се намира в клетки на Пуркиние и в

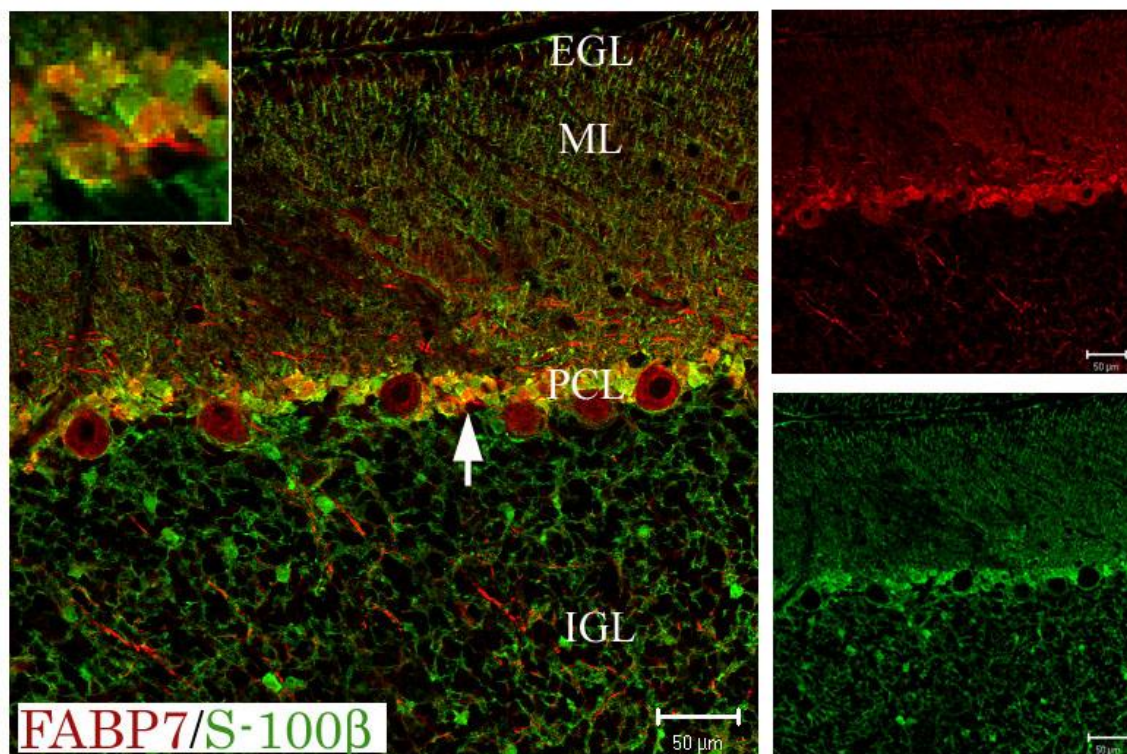


**Фигура 4.2.8.** Двойно оцветяване за FABP5 (червено) и NeuN (зелено) в церебелума на постнатална (P13) маймуна. Виждат се два вида клетки: FABP5<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (глава на стрелка) и FABP5<sup>+</sup>/NeuN<sup>-</sup> (стрелка). Машабна линия = 10  $\mu$ m. Звездички, тела на невроните на Пуркиние.



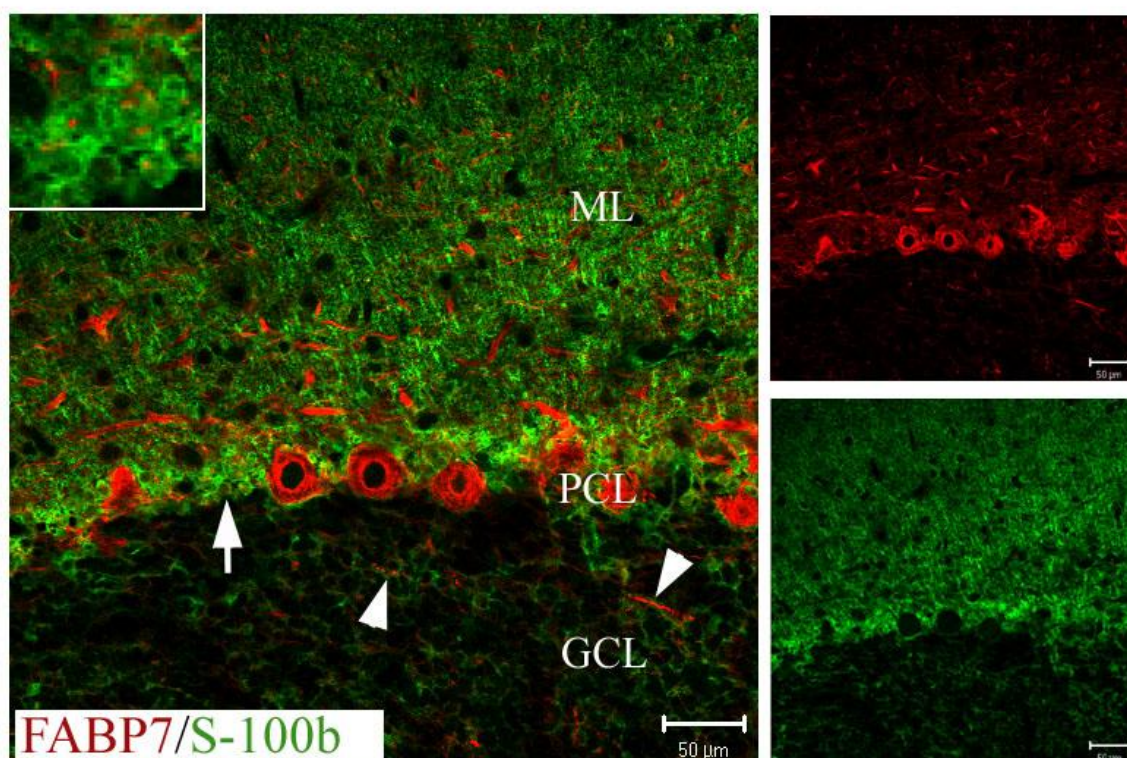


**Фигура 4.2.9.** Двойно оцветяване за FABP5 (червено) и S-100β (зелено), което разкрива наличието на двойно позитивни клетки (стрелка). Мащабна линия = 10 μm. Звездички, тела на невроните на Пуркиние.



**Фигура 4.2.10.** Двойно оцветяване за FABP7 (червено) и глиалния маркер S-100β (зелено) в малък мозък на постнатални (P13) примати. FABP7 се експресира в глията на Бергман (увеличен образ горе вляво). Увеличеният образ е близък изглед на обозначените със стрелка клетки. Мащабна линия = 50 μm. EGL, външен грануларен слой; IGL, вътрешен грануларен слой; ML, молекулярен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

кошчеви интерневрони (basket cells), позитивни за транспортера на ГАМК ( $\gamma$ -аминомаслена киселина) – GAT1. В допълнение, в постанатален церебелум, FABP7 показва имунореактивност и в глията на Бергман, която се маркира с астроцитния маркер S-100 $\beta$  (Фиг. 4.2.10). Такава, обаче, не се открива в малкомозъчната кора на възрастни екземпляри (Фиг. 4.2.11). Експресията на FABP7 в малък мозък след глобална церебрална исхемия не се различава от тази в контролен.



**Фигура 4.2.11.** Двойно оцветяване за FABP7 (червено) и глиалния маркер S-100 $\beta$  (зелено) в малък мозък на възрастни примати. FABP7 не се експресира в глията на Бергман (рамка). Главите на стрелки показват израстъци, експресиращи FABP7 в грануларния слой. Машабна линия = 50  $\mu$ m. GCL, грануларен слой; ML, молекулярен слой; PCL, слой на клетките на Пуркиние.

## 5. Обсъждане

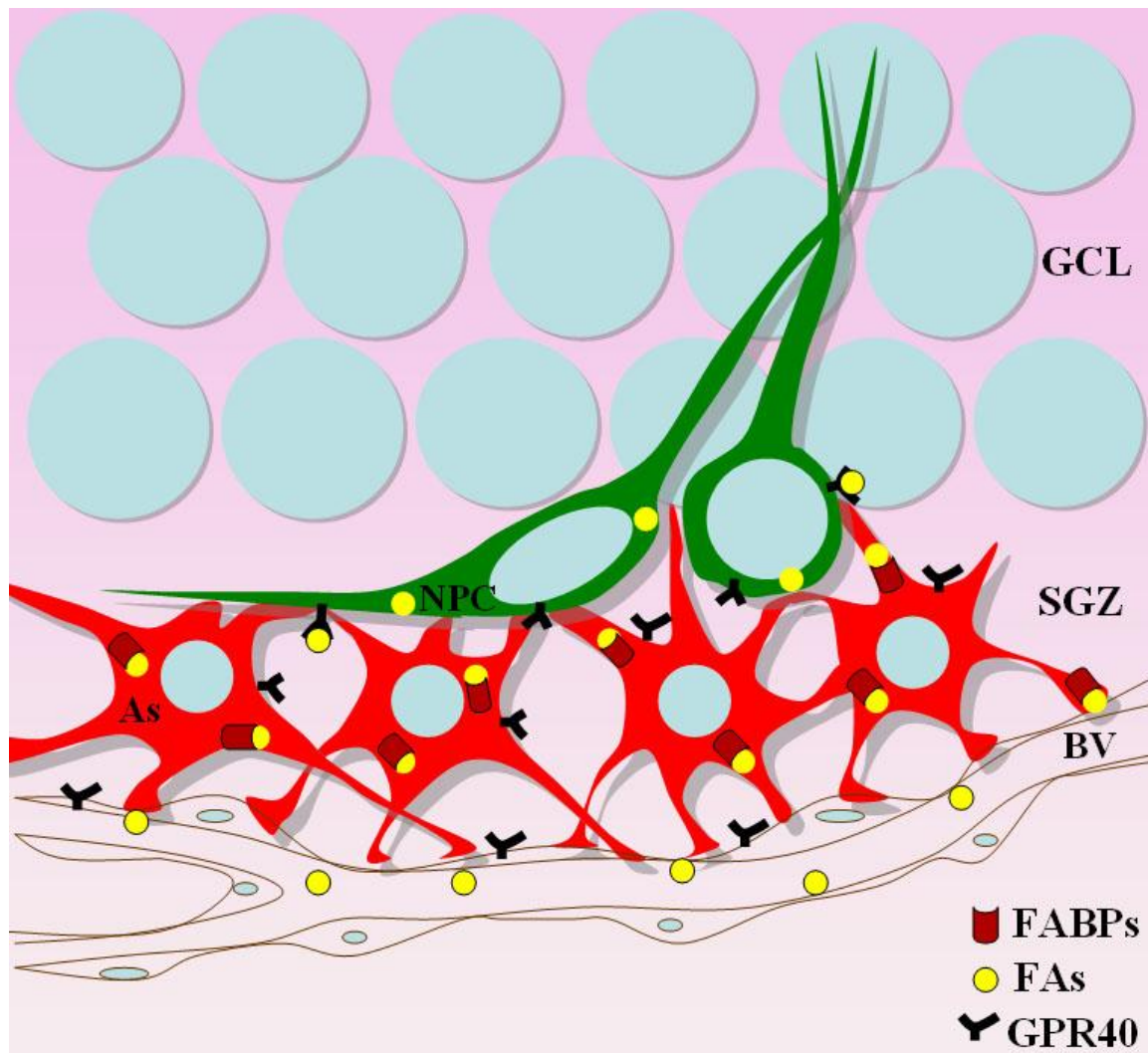
Изследване експресията на FABP в мозъка на маймуни представлява интерес, от една страна, защото тези протеини са рецептори за важните ПНМК и като такива медиатират действието им в клетката. От друга страна, липсват данни за експресията на FABP в мозъка на хора и затова резултатите получени от изследванията върху маймуни имат по-голямо значение от тези получени при гризачи. В настоящата работа, ние проучихме експресията на трите открити в мозъка типа протеини - FABP 3, 5 и 7, при *Macaca fuscata*. Прицелни на изследването бяха два региона на ЦНС: хипокамп и малък мозък. Общото е, че в тези региони се наблюдават два противоположни процеса - неврогенеза и невронална смърт след исхемия. Различното е, че в хипокампа тези два процеса се индуцират след мозъчна исхемия, докато в малкия мозък неврогенезата се наблюдава постнатално, а само невроналната смърт е постисхемична.

### 5.1. FABP в хипокамп

В неврогенната ниша на хипокамп на възрастни маймуни, ние открихме, че FABP 3, 5 и 7 преференциално се експресират в астроцити и nestin-позитивни прогениторни клетки. Нещо повече, FABP 5 и 7 бяха намерени и в *de novo* образувани, BrdU-позитивни, клетки в SGZ. Повечето от тези резултати са в съответствие с данните за експресията на FABP при гризачи (Owada, 2008). Ние, обаче, открихме и различия между гризачи и примати. В нашето изследване, нито един тип от проучваните FABP не беше намерен в зрели и в  $\beta$ III-tubulin-/ PSA-NCAM-позитивни незрели неврони. Вместо това, и трите типа FABP бяха намерени в S-100 $\beta$ -позитивни млади астроцити, които заобикалят “новородените” неврони в SGZ (Фиг.5.1). Тази особеност вероятно се дължи на междувидови различия, но е възможно да е резултат и от различни експериментални



модели. Ние считаме, че настоящите резултати дават допълнителна информация, необходима за точното разбиране ролята на FABP 3, 5 и 7 в невrogenната ниша на примати.



**Фигура 5.1.** Схематичен израз, представящ ролята на експресираните от астроцитите FABP в невrogenната ниша на хипокампа. FABP в астроцитите играе важна роля във вътреклетъчния транспорт на ПНМК от лумена на кръвоносните съдове до невроналните прогениторни клетки в SGZ. GCL, грануларен слой; SGZ, субгрануларна зона; BV, кръвоносен съд; FABPs, fatty acid-binding proteins; FAs, мастни киселини; GPR40, G протеин-свързан рецептор 40; As, астроцити; NPC, невронален прогенитор.

Неврогенезата протича в три последователни фази: (1) пролиферация, (2) миграция и диференциация, и (3) матурация и интеграция на прекурсорните клетки (Yamashima et al., 2007). Предишни проучвания върху адултната неврогенеза в нашия експериментален модел показва, че матурацията на прогениторните клетки е факт 2-3 месеца след

исхемията (Tonchev et al., 2006), докато новообразуваните BrdU-позитивни клетки в SGZ достигат максимална пролиферация през втората постисхемична седмица (Tonchev et al., 2003b). В настоящата работа, ние наблюдавахме значително увеличение експресията на FABP 5 и 7 на 15-я ден след исхемията. Следователно, може да се приеме, че увеличените нива на FABP в този период са свързани по-скоро с пролиферация и начална диференциация, отколкото с матурация и интеграция на прогениторите.

Имунофенотипизирането на BrdU-позитивните клетки в SGZ разкри, че 20-40% от тези клетки са негативни за астроцитни маркери (GFAP или S-100 $\beta$ ) и позитивни за маркери на прогенитори, като nestin или Musashi1. По този начин, клетките, които бяха с фенотип BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> бяха считани за недиференцирани неврални прогениторни клетки в SGZ на възрастни маймуни (Tonchev et al., 2003b). В настоящата работа, FABP 5 и 7 бяха намерени в BrdU-позитивни, както и в nestin- и S-100 $\beta$ -позитивни клетки. Трябва да отбележим, че ние не открихме BrdU<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>+</sup> клетки, въпреки че открихме FABP 5<sup>+</sup> и 7<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>+</sup> клетки. Процентът на FABP5<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> клетки беше съотносим с процена на FABP5<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>-</sup> клетки, както и процентът на FABP7<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> беше съотносим с процента на FABP7<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>-</sup> клетки. Тези резултати показват, че FABP5<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> и FABP5<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> клетки, както и FABP7<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> и FABP7<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> клетки, са недиференцирани неврални мозъчни прогениторни клетки. Тъй като nestin се експресира не само в прогенитори, но и в астроцити и ендотелни клетки, ние приехме, че FABP5<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> и FABP7<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> клетки са астроцити. Наличието, от една страна, на FABP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> и FABP<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>-</sup> клетки, и от друга страна, на FABP<sup>+</sup>/S-100 $\beta$ <sup>+</sup> клетки, предполага, че това са два различни клетъчни фенотипа. По-нататъшни проучвания могат да спомогнат за по-пълно разбиране произхода на тези клетки и тяхната съдба в SGZ.

През последните две десетилетия, изследванията в областта на невронауката доказаха, че всъщност астроцитите изпълняват много по-значима роля в мозъка, отколкото се е предполагало дотогава. Moore и колеги (1991) демонстрираха, че биосинтезата на ДНА от нейните прекурсорни мастни киселини ( $\alpha$ -LA и EPA) се извършва в астроцити и в ендотелни клетки, но не и в неврони. Нещо повече, установено е, че астроцитите могат да доставят ДНА на невроните (Kim et al., 1999). Както беше показано от Song и колеги (2002a), астроцитите в хипокампа подпомагат пролиферацията и диференциацията към неврони на прогениторни/стволови клетки в SGZ. Според нашите резултати, астроцитите се явяват главният тип клетки, експресиращи FABP в SGZ на възрастни маймуни. При това, ние наблюдавахме тези астроцити в близост до пролифериращи прогениторни клетки и до незрели неврони. Взети заедно, тези наблюдения предполагат, че FABP в астроцитите може да играят важна роля в доставянето на ПНМК за невроналните прогенитори и невроните. Важно е да се отбележи, че “новородените” или незрели неврони, като млади развиващи се клетки, се нуждаят от ПНМК за синтез на мембрани и развитие на дендритното дърво. Резултатите, изложени в настоящата работа, обаче, показаха, че нито един тип от експресираните в мозъка FABP, не се локализира в клетки с невронален фенотип. В този смисъл, астроцитите може би играят ролята на “мост” между ендотелните клетки на кръвоносните съдове и новообразуваните неврони в невrogenната ниша (Фиг.5.1).

Briscoe и колеги (2003) откриха, че иРНК за рецептора на МК, GPR40, е най-силно експресирана в мозък и в панкреас на хора, което предполага важна роля на този рецептор в посочените органи. Експресията на GPR40 в  $\beta$ -клетките на задстомашната жлеза е свързана с инсулиновата секреция. Ролята на GPR40 в мозъка, обаче, остава неизяснена. Една от хипотезите гласи, че GPR40 в мозъка е таргетен рецептор за свободни

мастни киселини и регулира невроналните функции, като липидно-сензорния механизъм в хипоталамуса и контрола над енергияния баланс (Pocai et al., 2006). Наскоро, Ма и колеги (2007) откриха, че GPR40 се експресира и в неврогенната ниша на хипокампа при постисхемични маймуни. След исхемия, експресията на GPR40 беше увеличена и локализирана в ендотелни клетки, астроцити, както и в прогениторни клетки в SGZ (Ma et al., 2007; Yamashima, 2008). Тези данни предполагат, че FABP може би регулират локалните нива на ПНМК. Последните се свързват с GPR40, действайки като екстрацелуларни сигнални молекули в неврогенната ниша, моделирайки образуването и диференцирането на нови неврони (Фиг.5.1).

**FABP3.** В настоящата работа, ние представихме детайлно описание на експресията на FABP3 в SGZ на възрастни примати. В предишни изследвания при гризачи, FABP3 беше открит в мозъка на постанатални и възрастни мишки, но не и в ембрионален мозък. Това предполага, че FABP3 не участва в ембрионалното развитие. В мозъка на гризачи, FABP3 се експресира предимно в зрели неврони (Owada et al., 1996b) и се смята, че играе роля за образуването на клетъчните израстъци и за формирането на синапси. За разлика от гризачите, в приматния мозък, FABP3 беше открит в астроцити, но не и в неврони. По-специално, ние не открихме експресия на FABP3 в диференциращи се към неврони прогениторни клетки. Проучвания върху мишки с инактивация на гена на FABP3, показаха, че липса на този протеин предизвиква намалено инкорпориране на ARA в мозъка (Murphy et al., 2005), подобно на намалената инкорпорация в сърцето (Vinas et al., 1999). Вероятно, FABP3 в хипокампаалните астроцити на примати, е въввлечен в транспорта на ARA от лумена на кръвоносните съдове до неврогенната ниша.

**FABP5.** При гризачи, експресията на иРНК на FABP5 в неврони и глиални клетки започва от средата на ембрионалното развитие, достига максимални

нива непосредствено преди раждане и намалява с възрастта (Owada et al., 1996b). Използвайки плъши модел, Owada и колеги (1996a, 1997) демонстрираха увеличена експресия на FABP5 при различни патологични условия. Така например, иРНК на FABP5 се увеличава в невроните, образуващи п. hypoglossus през 3-14 ден след притискане на нерва. Подобно увеличение се наблюдава и в астроцитите на хипокампа 24 часа след припадък, предизвикан от каинова киселина. В принципно съгласие с тези резултати, в нашият експериментален модел на глобална транзиторна исхемия на мозъка, FABP5 се увеличава в SGZ, както и в CA1 на 15 ден след патологичния момент. Мнозинството от FABP5 позитивни клетки показва астроцитен фенотип. В PC12 клетки (модел на невронални прогенитори *in vitro*), високите нива на FABP5 бяха асоциирани с увеличаване дендритното дърво на диференциращи се неврони (Liu et al., 2008). Съпоставяйки тези резултати с нашите наблюдения за увеличена експресия на FABP5 в SGZ след исхемия, ние допускаме, че FABP5 играе важна роля за развитието на клетъчните израстъци на новообразуваните неврони в SGZ.

**FABP7.** Експресията на иРНК на FABP7 достига максимални нива през средата на ембрионалното развитие, след което постепенно намалява след раждането (Owada et al., 1996b). В мозъка на гризачи, FABP7 се експресира в радиална глия (прогенитори за болшинството неврони в ЦНС) и астроцитите (Rousselot et al., 1997). Нашите резултати за експресията на FABP7 при примати съответсват на посочените при мишки. Освен това, FABP7 беше намерен в не-невронални поддържащи клетки, заедно с диазепам-свързващия инхибитор (DBI), което предполага, че DBI и FABP7 са въввлечени в енергийния метаболизъм на астроцитите и поддържат развитието и функциите на невроните (Yanase et al., 2002). В SGZ на маймуни, FABP, експресирани от астроцитите, са въввлечени в невrogenезата чрез доставяне на мастни киселини в невrogenната ниша.



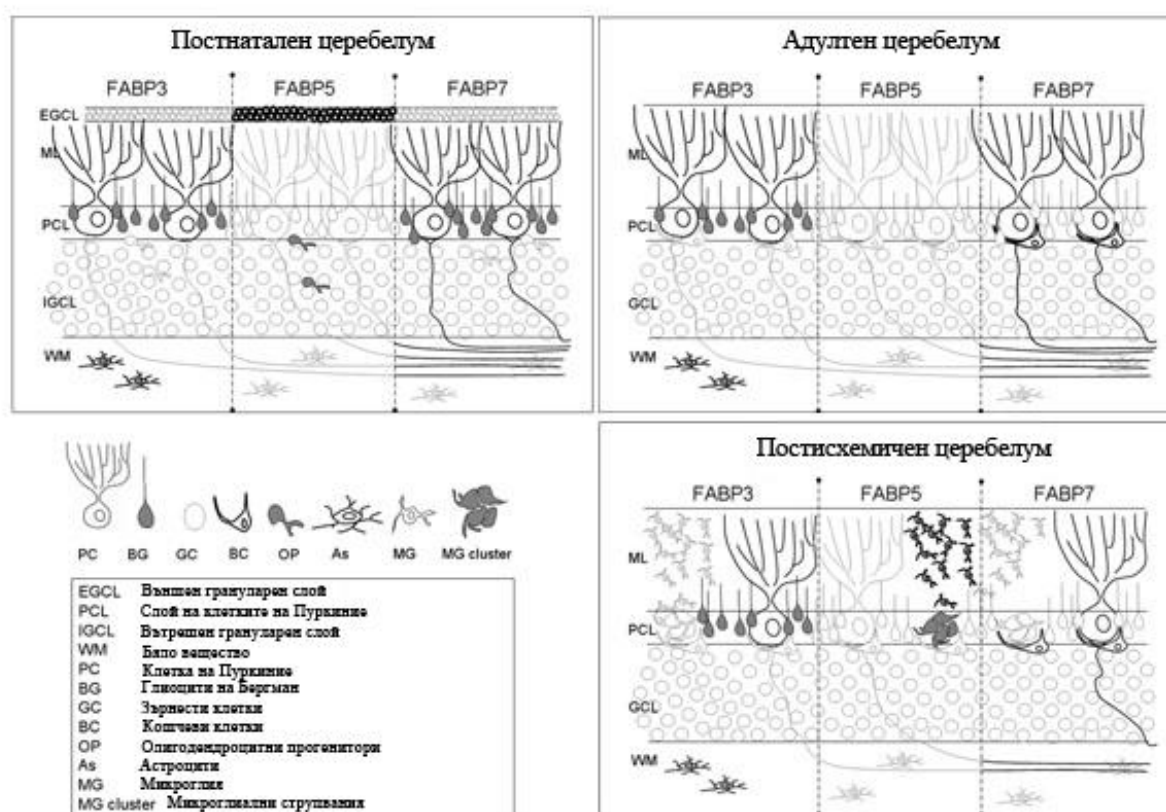
Увеличена експресия на FABP7 се наблюдава и при други заболявания, като синдром на Даун (Sanchez-Font et al., 2003) и шизофрения (Watanabe et al., 2007). В същото време, протеиновите нива на FABP7 са редуцирани при миши модел на депресия (Gass et al., 2008), което от своя страна съответства на предишни резултати за нарушен емоционален и поведенчески отговор при мишки с дефицит на FABP7 (Owada et al., 2006). В допълнение, при плъхове, FABP7 беше определен като таргетен ген на невrogenния транскрипционен фактор Pax6 и като такъв да стимулира пролиферацията, а да инхибира диференциацията (Arai et al., 2005). В нашето изследване, ние демонстрирахме експресията на FABP7 в пролифериращи BrdU-позитивни клетки. Скорошни изследвания на Aizawa и колеги (2011) в хипокамп на маймуни показаха сходна на описаната тук експресия на FABP7. Общо погледнато, FABP7 очевидно е въввлечен в транскрипционния контрол на прогениторните клетки в SGZ.

### *5.2. FABP в малък мозък*

В постнатален церебелум, трите типа FABP бяха експресирани по време на клетъчната пролиферация, миграция и диференциация. За разлика от инфантилния малък мозък, в този на възрастни маймуни наблюдавахме силна експресия на FABP 3 и 7, но не и на FABP5. След исхемия, обаче, само FABP5 показва драстична промяна в експресията си. Малкомозъчната кора при възрастни индивиди има 3-слойна структура (молекулярен слой, слой на клетките на Пуркиние и грануларен слой) (Armstrong and Hawkes, 2000). Емблематични клетки за церебелума са невроните на Пуркиние, които образуват едноименния слой. Тези клетки са изключително чувствителни на хипоксия (Hausman et al., 2007) и значителна загуба на неврони на Пуркиние се наблюдава при исхемичен инсулт (Kantor et al., 2007). В малък мозък липсват данни за невrogenеза при възрастни (Bonfani and Ponti, 2008), което предполага, че всяка промяна (ако има такава) в

експресията на FABP след транзиторна глобална исхемия на мозъка ще се дължи на патологично състояние. От друга страна, малкият мозък се характеризира с постнатална пролиферация във външния грануларен слой и диференциация и миграция във вътрешния грануларен слой на грануларните клетки. По този начин, различия в експресията на FABP в постнаталенocerebellum в сравнение с малък мозък на възрастен, ще предполага въвличането на FABP в неурогенезата.

**FABP3.** FABP3 е еволюционно запазен протеин и се експресира в разнообразни тъкани, както при гръбначните, така и при безгръбначните



**Фигура 5.2.** Сравнителна схема, представяща експресията на трите типа FABP в малък мозък на инфантилни и възрастни (контролни и исхемични) маймуни.

животни (Haunerland and Spener, 2004). Както беше изтъкнато вече, най-ранната експресия на FABP3 се наблюдава след раждането и е ограничена в сивото мозъчно вещество (Owada et al., 1996a). При възрастни гризачи, FABP3 е намерен в невроните – олфакторните митрални клетки,

хипокампални неврони, клетки на Пуркиние и грануларни клетки на малкия мозък (Owada et al., 1996b). В настоящата работа, ние показахме, че в малък мозък на маймуни, FABP3 се намира в клетките на Пуркиние и в глиалните клетки на Бергман. В допълнение, резултатите от имуноблота показаха, че протеиновото ниво на FABP3 не се променя в резултат на исхемичния инсулт, което съвпада с резултатите ни в хипокампа. Имунофлуоресцентният анализ показва сходна клетъчна експресия на FABP3 в малкия мозък на възрастни и постнатални маймуни (Фиг. 5.2). Взети заедно, тези резултати показват, че ролята на FABP3 е по-скоро свързана със запазване на нормалните нива на ПНМК (които са необходими за осъществяване на нормалните клетъчни функции), отколкото с динамичните процеси на клетъчна пролиферация и/или диференциация.

**FABP5.** За разлика от FABP3, експресия на FABP5 бе наблюдавана в астроцити, радиална глия и невронални клетки в мозъка на пре- и перинатални мишки (Owada et al., 1996a). FABP5 се локализира в различни части на мозъка по време на неврогенезата, невроналната миграция и диференциация (Liu et al., 2000). По отношение развитието на малкия мозък при гризачи, FABP5 е експресиран в пре- и перинаталния период, както във външния, така и във вътрешния грануларен слой. В съгласие с тези резултати са и нашите наблюдения, че в малък мозък на постнатални маймуни FABP5 се експресира във външния и отчасти във вътрешния грануларен слой (Фиг. 5.2). Външният зърнест слой е временна структура, която се наблюдава по време на късния ембрионален и ранния постнатален период. В този смисъл, експресията на FABP5 в този период показва важната му роля в образуването на грануларните клетки. Освен това, този тип FABP вероятно играе роля в невроналната миграция и диференциация, тъй като се намира и в мигриращи прекурсорни клетки, и в някои от грануларните неврони от вътрешния грануларен слой (най-вероятно

наскоро мигрирали млади неврони). Интересно, обаче е да се отбележи, че експресията на FABP5 в церебелума беше редуцирана при възрастни маймуни. Тези наблюдения отговарят на резултатите в хипокамп, където FABP5 не беше експресиран в SGZ на контролни възрастни, а в невrogenната ниша след исхемия и показва максимална експресия по време на пика на адултната невrogenеза (Tonchev et al., 2003a,b). В ранния постанатален период, олигодендроцитните прогенитори в мозъка също показват позитивност за S-100 $\beta$  (Nachem et al., 2005). В подкрепа на това, че поне част от FABP5 позитивните клетки са олигодендроцитни прогенитори, ние осъществихме двойно оцветяване на FABP5 с транскрипционния фактор Olig1, който се експресира в олигодендроцитни прогенитори и подпомага диференциацията към олигодендроцити в развиващия се мозък (Lu et al., 2001). Наличието на двойно позитивни FABP5/Olig1 клетки, означава, че FABP5 може би е въввлечен не само в невроналната, но и в олигодендроцитната диференциация.

За разлика от данните при гризачи, ние не намерихме експресия на FABP5 нито в неврони, нито в астроцити на хипокамп и церебелум на възрастни маймуни. Освен междувидовите различия, обяснение за тази вариабилност могат да бъдат и ниските нива на FABP5 в мозъка на възрастни маймуни, които не могат да бъдат уловени с метода на имунохистохимията. Така, резултатите от имуноблота показаха незначително ниски нива на експресия на FABP5 в контролен малък мозък. Имунофлуоресцентният анализ, от своя старна, показва FABP5 експресия в някои популации микроглиални клетки на ден 15 след инсульта. Такова несъответствие е разбираемо, ако се вземе предвид, че тази FABP5-позитивна микроглия беше намерена дифузно в зони, различни по големина и разстояние една от друга. Морфологично, FABP5-позитивните клетки в постисхемичен церебелум, наподобяваха морфологията на активирана микроглия/макрофаги, въпреки че микроглията в покой не

експресира FABP5. Двойните оцветявания за FABP5 и Iba1 показаха, че всички FABP5-позитивни клетки експресират и микроглиалния маркер Iba1, но не и обратното. Тези открития, заедно с наблюденията, че микроглиалните клетки формират клетъчни кълъстери (групирания), предполагат, че FABP5 се експресира само в исхемия-активираната микроглия, отговорна за фагоцитозата на загиващите неврони. В подкрепа на това заключение, предишни изследвания демонстрираха, че FABP5 се експресира в клетки с фагоцитираща способност: в ретина, тимус, слезка, лимфни възли и яйчници. Освен това, микроглиалните кълъстери наподобяваха сома на клетка на Пуркиние. Най-простата интерпретация на това наблюдение е, че активираната микроглия фагоцитира мъртва клетка на Пуркиние. Това се подкрепя и от данните, че броят на невроните на Пуркиние значително намалява след исхемия (Kantor et al., 2007; Hausman et al., 2007). Двойното оцветяване за FABP5 и parvalbumin, маркер за клетки на Пуркиние, показва, че в зоната, инфилтрирана с активирана микроглия, липсват клетки на Пуркиние. Тези резултати сочат, че на постисхемичен ден 15, FABP5 се експресира от активирана микроглия, инфилтрираща исхемичните зони. Възможно е, активираната микроглия да е свързана със способността на макрофагите да преобразуват АРА и други ненаситени МК от вътреклетъчни източници, в простагландини и левкотриени, които са въввлечени във възпалителните или имунни процеси (Wang et al., 2007). Взети заедно, настоящите данни за експресията на FABP5 в малък мозък на постнатални и възрастни (неисхемични и исхемични) маймуни предполагат, че FABP5 участва в два различни процеса: неврогенеза и възпалителен отговор при исхемия. Тези данни в церебелума съответстват на наблюденията ни в хипокампа, където FABP5 беше открит в пролифериращи клетки в неврогенната ниша и в микроглиални клетки в исхемия-чувствителната CA1 зона.

**FABP7.** Експресията на FABP7 се регистрира в най-високи нива в развиващ се мозък и драстично намалява при възрастни (Owada et al., 1996a). Този тип FABP се намира в радиалната глия на развиващ се и в астроцитите на възрастен мозък, като експресията му се регулира в отговор на взаимодействие с неврони. При гризачи, има данни, че FABP7 се експресира от астроцити и радиална глия в различни мозъчни региони, а също и от глията на Бергман в церебелума (Rousselot et al., 1997; Owada, 2008). Тук, ние съобщаваме, че FABP7 се експресира от глиоцити на Бергман на постнатален, но не и на възрастен церебелум, което предполага специална роля на FABP7 в младия незрял малък мозък (Фиг. 5.2). Възможно е, експресията на FABP7 в глиоцитите на Бергман да има отношение към миграцията на прекурсорите на грануларните клетки и/или да бъде въввлечен във взаимоотношенията глиоцити на Бергман–клетки на Пуркиние (Bellamy, 2006). FABP7, подобно на предположената роля в хипокамп, може да доставя ДНА за развитието на клетъчните израстъци. В малък мозък на възрастни (контролни и исхемични) маймуни, експресията на FABP7 се съхранява в клетките на Пуркиние и обгръщащите ги израстъци на кошчеви интерневрони. Чрез имунохистохимията не бяха разкрити различия в експресията на FABP7 преди и след исхемията (Фиг. 5.2). Имуноблот анализът, обаче, разкри постепенно увеличаване нивото на FABP7, което беше максимално на 15 ден след исхемията. Този резултат е неочакван, тъй като FABP7 се експресира предимно в клетките на Пуркиние, много, от които, както вече изтъкнахме, умират след исхемията. В допълнение, нито глията в покой, нито активираната микроглия в постисхемичен малък мозък показаха имунореактивност към FABP7. Този контраст в резултатите може да бъде обяснен с увеличени нива на протеина в междуклетъчното пространство. За изясняване на този въпрос, обаче, са необходими допълнителни експерименти.

### 5.3. FABP в клиничната неврология

От откриването им до сега протеините, свързващи мастните киселини – FABP, са били обект на изследване при множество проучвания. Тези изследвания са правени предимно при опитни животни, най-вече при гризачи. Благодарение на тях днес се знае много за типовете FABP, тяхното разпределение в различните тъкани и органи, структурата им, афинитета им към различните МК и по-малко за тяхната роля в клетката. Проучванията за хистологичното разпределение на тези протеини в мозъка при примати са значително по-малко в сравнение с тези при гризачи, а при хора дори липсват такива. В клиничната практика интересът към FABP е насочен предимно към възможността тези протеини да се използват като биомаркери при някои заболявания. Това е така, защото изследването нивата на тези протеини в серум и/или ликвор на хора е достъпна процедура. От друга страна, бързата и навременна диагноза на редица заболявания е от голямо значение за изхода, развитието и последиците от заболяването. От тази гледна точка, настоящата работа представлява мост между експерименталната работа при гризачи и клиничната практика, като предоставя морфологична основа за анализ на получените при хората данни.

Най-проучван от цялото семейство е FABP3, не само защото е широко разпространен в редица тъкани, но и като сърцев тип, се свързва с най-честата патология на сърцето и причина за смърт сред хората, а именно острия миокарден инфаркт (ОМИ). Тези проучвания показаха, че FABP3 може да бъде използван като ранен серумен маркер за ОМИ (Glatz et al., 2002). Логично, тези изследвания се пренесоха и в неврологичните проучвания, тъй като FABP3 се експресира и в мозъка. Клинично анализирани са и другите FABP открити в ЦНС – FABP 5 и 7, като възможностите за приложението на FABP5 в неврологичната практика са най-слабо проучени.

**FABP3.** Пилотно изследване на Zimmermann-Ivol и колеги (2004) проведено при пациенти с мозъчен инфаркт и контролни здрави индивиди, показва значително ранно увеличение на FABP3 в серума на инсултните болните (< 12 час). Така нивото на FABP3 в серума е по-показателен маркер от това на S-100 $\beta$  и neuron-specific enolase (NSE). Последните са едни от най-проучване биомаркери в серум и ликвор на пациенти с инсулт (Cunningham et al., 1991). Освен това, според изследването (Zimmerman-Ivol et al., 2004) чувствителността и специфичността на FABP3 (68,2%, 100%) са значително по-високи от тези на S-100 $\beta$  и NSE (15%, 95.5% и 55%, 36,4%, респ.). За отдиференциране на повишените нива FABP3 в серума при мозъчен инсулт от тези при ОМИ, различните автори предлагат едновременното изследване на creatinin kinase –MB (СК-МВ) фракция и troponin-1 (Zimmerman-Ivol et al., 2004) или миоглобин (Pelsers et al., 1999), или FABP7 (Wunderlich et al., 2005). Дори нещо повече, концентрацията на серумния FABP3 корелира с тежестта на неврологичния дефицит и изхода от заболяването (Wunderlich et al., 2005).

В други проучвания, нивото на серумния FABP3 е изследвано при пациенти с дегенеративни неврологични заболявания. Например, в серума на пациенти с деменция с телца на Леви или с Паркинсонова болест FABP3 е значително увеличен в сравнение с тези с болест на Алцхаймер (Wada-Isoe et al., 2008). Завишени нива на FABP3 в серум и в цереброспинална течност е докладвано и при болестта на Creutzfeldt-Jakob (Steinacker et al., 2004).

Някои автори откриват връзка между нивата на FABP3 в ликвора и тежестта на клиничната картина при субарахноидален кръвоизлив (Zanier et al., 2008).

**FABP5.** Нивата на FABP5 в серум и ликвор са най-слабо проучени при пациенти с неврологични заболявания. Някои автори свързват повишените нива на FABP5 в ликвор с некроза на мозъка (Zimmerman-Ivol et al., 2004).



Това явно корелира с липсата на експресия на FABP5 при нормални условия, каквато ние установихме при нашите експерименти и по-късната му поява след даден патологичен момент. Други автори търсят връзката между генната експресия на трите типа FABP в мозъка със заболявания като аутизъм и шизофрения (Maekawa et al., 2010).

**FABP7.** FABP7, заедно с FABP3 се увеличава в серума на пациенти с мозъчен инфаркт още в първите часове след инсульта. Двата протеина се предлагат като маркери за мозъчен инфаркт (Pelsers, et al., 2004; Wunderlich et al., 2005). Това може да бъде обяснено с получените резултати, че FABP 3 и 7 нормално се откриват в мозъка. Може да се предполага, че след инсульта те бързо попаднат в кръвообръщението и нивата им в серума се регистрират като завишени. За съжаление, нашият експериментален модел не включва изследване на FABP нивата в серум и ликвор, но тази идея може да бъде основа за бъдещи изследвания.

Най-голям е интересът към FABP7 в невроонкологията. Това е така, тъй като досегашните изследвания при гризачи, а също и резултатите от нашите експерименти показаха, че FABP7 се открива, в пролифериращи, BrdU позитивни клетки. Увеличената цитоплазмена експресия на FABP7 в мозъчни тумори от аутопсионни материали се свързва с неврална диференциация и се асоциира с по-благоприятния им хистологичен вариант (Retrosi et al., 2011).

## 6. Заключение

В настоящия труд, ние изследвахме връзката между експресията на свързващите мастни киселини протеини – FABP 3, 5 и 7, и неврогенезата при примати. Използвахме модел на глобална церебрална исхемия, при който се индуцира неврогенезата в хипокампа на възрастни маймуни. Изследвахме и малък мозък, защото от една страна съдържа неврогенна ниша в първите месеци след раждане, а от друга, подобно на хипокампа е чувствителна на исхемия структура. Ние открихме, че в неврогенната ниша на хипокампа при примати, FABP 3, 5 и 7 са експресирани предимно в астроцити, намиращи се в близост до невроналните прогениторни клетки и най-вероятно спомагат за поддържане на подходящи нива на ПНМК в неврогенната ниша. FABP 5 и 7 показаха значително увеличение на експресията си 15 дни след исхемията, като бяха открити и в пролифериращи клетки. FABP 5 и 7, директно или индиректно чрез астроцитите, могат да допринесат и за пролиферацията на прогениторните клетки.

В малък мозък резултатите показаха, че FABP, и по-специално FABP 3 и 7, вероятно спомагат за запазване на подходящите нива на ПНМК, които се изискват за нормалното функциониране както на постнаталния, така и на възрастния малък мозък. FABP5 участва в образуването на грануларните неврони в незрелия церебелум, и в реактивните процеси след исхемия в церебелум на възрастни.

Получените резултати показват участието на свързващите мастни киселини протеини в състояния, локуси и процеси, свързани с неврогенезата, но и с други когнитивни процеси.

## 7. Изводи

1. FABP спомагат за поддържане на подходящи нива на  $\omega$ -МК в невrogenната ниша.
2. FABP, директно или индиректно чрез астроцитите, допринасят и за пролиферацията на прогениторните клетки в хипокампалната невrogenна ниша.
3. FABP, и по-специално FABP 3 и 7, спомагат за запазване на подходящите нива на  $\omega$ -МК, които се изискват за нормалното функциониране на малкия мозък както в постнаталния период, така и в зряла възраст.
4. FABP5 участва в образуването на зърнестите неврони в незрелия cerebellum, и в реактивните процеси след исхемия в зряла възраст.
5. Анализа на FABP в мозък на примати след исхемия поставя морфологична основа, която да обясни ефектите на  $\omega$ -МК в ЦНС.

## **8. Справка за приносите на дисертационния труд**

- 8.1. За първи път се описва клетъчната експресия на FABP 3, 5 и 7 в неврогенната ниша на хипокамп при примати.
- 8.2. Новост е описаната статистически значима промяна в експресията на FABP 5 и 7, и липсата на такава в експресията на FABP3, в хипокамп преди и след транзиторна глобална церебрална исхемия.
- 8.3. Оригинални са данните относно експресията на FABP 3, 5 и 7 в малък мозък на възрастни маймуни и влиянието на исхемията върху експресията им.
- 8.4. Нови са резултатите, доказващи експресията на FABP 3, 5 и 7 в малък мозък в контекста на постнатална неврогенеза.

## 9. Публикации във връзка с дисертационния труд

### 9.1. Статии

1. **Boneva NB**, Kaplamadzhiev DB, Sahara S, Kikuchi H, Pyko IV, Kikuchi M, Tonchev AB, Yamashima T. *Expression of fatty acid-binding proteins in adult hippocampal neurogenic niche of postischemic monkeys*. Hippocampus 2011;21:162-171.
2. **Boneva NB**, Mori Y, Kaplamadzhiev DB, Kikuchi H, Zhu H, Kikuchi M, Tonchev AB, Yamashima T. *Differential expression of FABP 3, 5, 7 in infantile and adult monkey cerebellum*. Neurosci Res. 2010;68:94-102.
3. **Boneva NB**, Kikuchi M, Minabe Y, Yamashima T. *Implication of FABP and GPR40 in adult neurogenesis*. Review, J Pharmacol Sci. 2011; 116(2):163-72.
4. Ma D, Lu L, **Boneva NB**, Warashina S, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Nakaya M, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T. *Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus*. Hippocampus 2008;18:326-333.

### 9.2. Доклади във връзка с дисертационния труд

1. 17-и симпозиум “Хипокамп и когнитивни функции”; 22-23.11.2008г, Каназава, Япония. *Role of FABPs in the Postischemic Neurogenesis of Monkeys*. – презентация;
2. Биомедицински Форум 21, 09.03.2011г, Медицински Университет, Варна; България. Българско дружество по клетъчна биология. *О-МЕГАУМ: клетъчни рецептори за мастни киселини в мозъка и невrogenеза*. – презентация;
3. XX Национален конгрес на Българското Анатомично Дружество и IX Интернационален Симпозиум по Клинична Анатомия; 30.09–2.

- 10.2011г, Варна, България; *Differential expression of Fatty Acid-Binding Proteins in Neurogenic Zones in Monkey Brain.* – презентация;
4. Юбилейна национална конференция по Патология „50 години Академична Патология във Варна”; 07-09.10.2011г Медицински Университет – Варна, България. Българско дружество по патология. *Експресия на протеините, свързващи мастни киселини в невrogenни зони в мозъка на маймуни.* – постер.

## 10. Библиография

1. Aizawa K, Ageyama N, Terao K, Hisatsune T. Primate-specific alterations in neural stem/progenitor cells in the aged hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2011;32:140-150.
2. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962;135:1127-1128.
3. Arai Y, Funatsu N, Numayama-Tsuruta K, Nomura T, Nakamura S, Osumi N. Role of *Fabp7*, a downstream gene of *Pax6*, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J Neurosci*. 2005;25:9752-9761.
4. Armstrong CL, Hawkes R. Pattern formation in the cerebellar cortex. *Biochem Cell Biol*. 2000;78:551-562.
5. Bellamy TC. Interactions between Purkinje neurons and Bergmann glia. *Cerebellum*. 2006;5:116-126.
6. Beltz BS, Tlusty MF, Benton JL, Sandeman DC. Omega-3-fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci Lett*. 2007;415:154-158.
7. Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ. Requirement for the heart-type fatty acid-binding protein in cardiac fatty acid utilization. *Faseb J*. 1999;13:805-812.
8. Bonfani L, Ponti G. Adult mammalian neurogenesis and the New Zealand white rabbit. *Vet J*. 2008;175(3):310-331.
9. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278:11303-11311.
10. Cervos-Navarro J, Diemer NH. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev Neurobiol*. 1991;6:149-182.
11. Cunningham RT, Young IS, Winder J, O'Kane MJ, McKinstry S, Johnston CF, Dolan OM, Hawkins SA, Buchanan KD. Serum neuron specific enolase (NSE) levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest*. 1991;21:497-500.
12. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med*. 1998;4:1313-1317.

13. Gass P, Leonardi-Essmann F, Zueger M, Spanagel R, Gebicke-Haerte PJ. Transcriptional changes in insulin- and lipid metabolism-relates genes in the hippocampus of olfactory bulbectomized mice. *J Neurosci Res.* 2008;86:3184-3193.
14. Glatz FJ, van der Voort D, Hermens WT. Fatty acid-binding protein as the earliest available plasma marker of acute myocardial injury. *J Clin Ligand Assay.* 2002;25:167-177.
15. Hachem S, Aguirre A, Vives V, Marks A, Gallo V, Legraverend C. Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia.* 2005;51:81–97.
16. Haunerland NH, Spener F. Properties and physiological significance of fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biol.* 2004;33:99-123.
17. Hausman R, Seidl S, Betz P. Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum. *Int J Legal Med.* 2007;121:175-183.
18. Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Li Y, Gage FH. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci.* 2007;27:9400-9407.
19. Kantor O, Schmitz C, Feiser J, Brasnjevic I, Korr H, Busto R, Ginsberg MD, Schmidt-Kastner R. Moderate loss of cerebellar Purkinje cells after chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol.* 2007;113:549-558.
20. Kim HY, Edsall L, Garcia M, Zhang H. The release of polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenation in the brain. *Adv Exp Med Biol.* 1999;447:75-85.
21. Liu LW, Almaguel FG, Bu L, De Leon DD, De Leon M. Expression of E-FABP in PC-12 cells increases neurite extension during differentiation: Involvement of n–3 and n–6 fatty acids. *J Neurochem.* 2008;106:2015-2029.
22. Liu Y, Longo LD, De Leon M. In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain. *Brain Res.* 2000;852:16-27.
23. Lu QR, Yuk D, Akbarta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH. Sonic Hedgehog – regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron.* 2000;25:317-329.
24. Lu QR, Cai L, Rowitch D, Cepko CL, Stiles CD. Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocytes formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex. *Nat Neurosci.* 2001;4:973-974.
25. Ma D, Tao B, Warashima S, Kotani S, Lu L, Kaplamadzhiev DB, Yamashima T. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neurosci Res.* 2007a;58:394-401.



26. Ma D, Lu L, Boneva NB, Warashina S, Kaplamadziev DB, Mori Y, Nakaya MA, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. *Hippocampus* 2007b;18:326-333.
27. Maekawa M, Iwayama Y, Arai R, Nakamura K, Ohnishi T, Toyota T, Tsujii M, Okazaki Y, Osumi N, Owada Y, Mori N, Yoshikawa T. Polymorphism screening of brain-expressed FABP7, 5 and 3 genes and association studies in autism and schizophrenia in Japanese subjects. *J Hum Genet.* 2010;55(2):127-30.
28. Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem.* 1991;56:518-524.
29. Morrison SJ, Shah NM, Anderson D. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997;88:287-298.
30. Murphy EJ, Owada Y, Kitanaka N, Kondo H, Glatz JF. Brain arachidonic acid incorporation is decreased in heart fatty acid binding protein gene-ablated mice. *Biochemistry.* 2005;44:6350-6360.
31. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol.* 1999;39(4):569-578.
32. Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996a;42:156-160.
33. Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat.* 1996b;12:113-122.
34. Owada Y, Utsunomiya A, Yoshimoto T, Kondo H. Changes in gene expression for skin-type fatty acid binding protein in hypoglossal motor neurons following nerve crush. *Neurosci Lett.* 1997;223:25-28.
35. Owada Y. Fatty acid binding protein: Localization and functional significance in the brain. *Tohoku J Exp Med.* 2008;214:213-220.
36. Pelsers MM, Chapelle JP, Knapen M, Vermeer C, Muijtjens Am, Hermens WT, Glatz JF. Influence of age and sex and day-to-day and within-day biological variation on plasma concentrations of fatty acid-binding protein and myoglobin in healthy subjects. *Clin Chem.* 1999; 45(3):441-443.

37. Pocai A, Lam TK, Obici S, Gutierrez-Juarez R, Muse ED, Arduini A, Rossetti L. Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest*. 2006;116:1081–1091.
38. Retrosi G, Sebire NJ, Bishay M, Kiely EM, Anderson J, De Coppi P, Resca E, Rampling D, Bier N, Mills K, Eaton S, Pierro A. Brain lipid-binding protein: a marker of differentiation in neuroblastic tumors. *J Pediatr Surg*. 2011;46(6):1197-200.
39. Rousselot P, Heintz N, Nottenbohm F. Expression of brain lipid binding protein in the brain of the adult canary and its implications for adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 1997;385:415-426.
40. Sanchez-Font MF, Bosch-Comas A, Gonzalez-Duarte R, Marfany G. Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance. *Nucleic Acids Res*. 2003;31: 2769-2777.
41. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neural degeneration. *Brain Res*. 2000;874:123-130.
42. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002a;417:39–44.
43. Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewczuk P, Poser S, Kretschmar HA, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid-binding protein as a potential diagnostic marker for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 2004;370(1):36-9.
44. Stoykova A, Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci*. 1994;14:1395-1412.
45. Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:11.1–11.23.
46. ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HOM, Renier WO. Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*. 2003;250:1025-1036.
47. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia*. 2003a;42:209-224.
48. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci*. 2003b;23:292-301.
49. Tonchev AB, Yamashima T. Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus. *Exp Neurol*. 2006;198:101-113.

50. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2:266-270.
51. Wada-Isoe K, Imamura K, Kitamaya M, Kowa H, Nakashima KJ. Serum heart-fatty acid binding protein levels in patients with Lewy body disease. *Neurol Sci*. 2008;266(1-2):20-24.
52. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007;184:53-68.
53. Watanabe A, Toyota T, Owada Y, Hayashi T, Iwayama Y, Matsumata M, Ishitsuka Y, Nakaya A, Maekawa M, Ohnishi T, Arai R, Sakurai K, Yamada K, Kondo H, Hashimoto K, Osumi N, Yoshikawa T. Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLoS Biol* 2007;5:e297.
54. Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, Spener F, Glatz JF, Wallesch CW, Pelsers MM. Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *J Neurol*. 2005;252(6):718-24.
55. Yamashima T, Saido TC, Takira M, Miyazawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T. Transient brain ischaemia provokes Ca<sup>2+</sup> PIP<sub>2</sub> and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci*. 1996;8:1932-1944.
56. Yamashima T, Tonchev AB, Yukie M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: Endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci*. 2007;18:67-82.
57. Yamashima T. A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Prog Neurobiol*. 2008;84:105-115.
58. Yamashita A, Makita K, Kuroiwa T, Tanaka K. Glutamate transporters GLAST and EAAT4 regulate postischemic Purkinje cell death: an in vivo study using a cardiac arrest model in mice lacking GLAST or EAAT4. *Neurosci Res*. 2006;55:264-270.
59. Yanase H, Shimizu H, Yamada K, Iwanaga T. Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid-binding protein. *Arch Histol Cytol*. 2002;65:27-36.
60. Zanier ER, Longhi L, Fiorini M, Cracco L, Bersano A, Zoerle T, Branca V, Monaco S, Stocchetti N. Increased levels of CSF heart-type fatty acid-binding protein and tau protein after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;102:339-43.
61. Zimmerman-Ivol CG, Burkhard PR, Floch-Rohr J, Allard L, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Fatty acid bonding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(1):66-72.

## 11. Благодарности

Най-сърдечни благодарности на моите научни ръководители – доц. д-р Тончев и проф. д-р Делева, както и на моя научен консултант проф. д-р Ямашима, за безценните им напътствия и съвети в процеса на работа, за професионализма им, за вярата и доверието им в мен, и за предоставените ми възможности за изява.

Благодаря на колегите от Катедрата по Неврохирургия при Университета на Каназава, Япония - С. Сахара и Х. Кикучи, които съдействаха за извършването на хирургичните процедури и грижите за маймуните. Благодаря и на Й. Мори от същата катедра за това, че направи имуноблот експеримента за малък мозък.

Изследванията бяха финансирани от стипендия на Министерството на науката и образованието на Япония.

Благодарности на колегите от Катедрата по Неврология, на доц. Генов, Катедра по Патология и доц. Чалдъков, Лаборатория по Клетъчна Биология, за подкрепата и доверието им.

Благодаря на д-р Феодора Иванова за това, че сподели успехите и провалите на експериментите ми и за пълноценните дискусии, които водехме по разнообразни научни въпроси.

Благодаря на родителите си, на брат си и на съпруга си за обичта и моралната подкрепа, която ми оказваха през цялото време, и за търпението, което проявиха.

На приятелите ми Пабло Ромеро-Каскон, Алесандро Перна и Казухико Хасегава също благодаря за това, че ме насърчаваха и направиха престоя ми в Япония още по-приятен.