

**Медицински Университет “Проф. Параскев Стоянов” - гр. Варна**  
**Факултет по Медицина**  
**Катедра по анатомия, хистология и ембриология**

**Д-р Меглена Валдемарова Ангелова**

**Анализ на прогениторни клетки  
по време на развитието на палиума  
при човек**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор”**

Варна, 2015

Медицински Университет “Проф. Параскев Стоянов” - гр. Варна  
Факултет по Медицина  
Катедра по анатомия, хистология и ембриология

**Д-р Меглена Валдемарова Ангелова**

**Анализ на прогениторни клетки  
по време на развитието на палиума  
при човек**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

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

Научен ръководител: доц. д-р Ваня Горанова Стефовска, дм  
Научен консултант: проф. д-р Антон Божидаров Тончев, дмн

Официални рецензенти: проф. д-р Николай Е. Лазаров, дмн  
проф. д-р Стефан Т. Сивков, дм

Варна, 2015

Дисертационният труд съдържа 120 страници и е онагледен със 100 фигури и една таблица. Литературната справка съдържа 153 заглавия, от които едно е на кирилица, а останалите – на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от катедрен съвет на катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – Варна. Имунофлуоресцентните изследвания са извършени в катедрата по анатомия, хистология и ембриология, Медицински университет – Варна и катедра по физиология на растенията и молекулярна биология към Биологичния факултет на Пловдивския университет.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ....., от ....., в .... аудитория на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна на открито заседание на научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение в библиотеката на МУ - гр. Варна.

## Съдържание

<b>Използвани съкращения</b> .....	5
<b>1. Увод</b> .....	6
<b>2. Цел и задачи</b> .....	8
<b>3. Материали и методи</b> .....	9
3.1. Обект на изследване .....	9
3.2. Обработка на тъканите .....	9
3.3. Анализ на препаратите .....	10
3.4. Статистическа обработка .....	11
<b>4. Резултати</b> .....	12
4.1. Гъстота на Zbtb20 експресиращите клетки .....	12
4.2. Дял на Zbtb20 експресиращите клетки от всички прогенитори .....	19
4.3. Ко-локализация на Zbtb20 и Sox2 .....	23
4.4. Гъстота на Sox2 експресиращите клетки .....	27
4.5. Дял на Sox2 експресиращите клетки от всички прогенитори .....	32
4.6. Ко-локализация на Sox2 и Pax6 .....	38
<b>5. Обсъждане</b> .....	42
<b>6. Изводи</b> .....	52
<b>7. Приноси на дисертационния труд</b> .....	53
<b>8. Публикации във връзка с дисертационния труд</b> .....	54
<b>9. Участия в научни форуми</b> .....	54
<b>Благодарности</b> .....	55

## Съкращения

**ГАМК** – гама-аминомаслена киселина  
**Г.с.** – гестационна седмица  
**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина  
**ЦНС** – централна нервна система  
**aRG** – апикална радиална глия  
**bRG** – базална радиална глия  
**CP** – кортикална плочка  
**DAPI** – 4',6'-диамино-2-фенилиндол  
**IFL** – вътрешен фиброзен слой  
**IP** – интермедиерни прогенитори  
**iSVZ** – вътрешна субвентрикулна зона  
**IZ** – интермедиерна зона  
**LGE** – латерална ганглионна емненция (ЛГЕ)  
**MGE** – медиална ганглионна емненция (МГЕ)  
**MZ** – маргинална зона  
**OFL** – външен фиброзен слой  
**oRG** – oSVZ radial glia like cells  
**oSVZ** – външна субвентрикулна зона  
**Pax6** – paired box protein 6  
**RG** – радиални глиални клетки  
**Sox2** – sex determining region Y-box 2  
**SVZ** – субвентрикулна зона  
**Tbr** – T-box family transcription factor  
**VZ** – вентрикулна зона  
**Zbtb20** – BTB zinc finger gene

## 1. Увод

Централната нервна система (ЦНС) и особено главният мозък са най-сложно устроените анатомични структури, които са се появили и развили в еволюцията. Уникална за бозайниците е крайномозъчната кора и особено филогенетично най-новият изокортекс (неокортекс). Тази част от кората се състои от различни видове неврони, организирани в шест слоя радиално и в многобройни функционални полета тангенциално, както и от различни по вид глиални клетки. По време на еволюцията крайномозъчната кора увеличава силно своята повърхност, като това е съпроводено от добавяне на нови, както и от допълнително усложняване на съществуващите, функционални подразделения. Така се достига до повече от 52 корови полета при човека по Brodmann, като изокортексът обхваща около 90% от площта на крайномозъчната кора. Останалата част се представя от еволюционно по-стария ало- и палеокортекс с 3-5 слойно подреждане на невроните. Коровите неврони, свързани по между си в строго определени и разнообразни функционални системи, представляват морфологичният субстрат на човешките възприятия, двигателна дейност, когниция и съзнание. Крайномозъчната кора се образува предимно през пренаталния период при човека, като клетките ѝ произхождат от стволови и прогениторни клетки, локализирани в палиума на развиващия се теленцефалон. Броят и типът на клетъчните деления на тези клетки определя крайния брой на невроните, а допълнителни механизми на диференциация предопределят тяхната ламинарна и ареална идентичност. Молекулните сигнали, които обуславят тези процеси за стволовите и прогениторните клетки са ендеогенни и екзогенни. Тези фактори се активират в определена последователност и контролират индивидуално или в комбинация процесите на пролиферация, миграция и диференциация на стволовите и прогениторните клетки. Много проучвания са съсредоточени върху изследването и изясняването на ролята на редица

гени и на кодираните от тях молекули като ендогенни регулатори на диференциацията на крайномозъчните неврони. Вродени нарушения в процеса на формирането на крайномозъчната кора обуславят редица неврологични заболявания, затова пълното разбиране на неговите регулаторни механизми би допринесло за развитието и усъвършенстването на клиничната неврология.

## **2.Цел и задачи**

**2.1. Цел:** Изследване на зони на човешки ембрионален и фетален дорзален палиум (бъдещ кортекс) и откриване на нови молекулни сигнали, експресирани в тези зони.

### **2.2. Задачи:**

1. Получаване на тъкани от човешки ембрионален и фетален теленцефалон.
2. Фиксация и хистологична обработка на тъканите за имунохистохимичен анализ.
3. Осъществяване на имунохистохимични оцветявания за транскрипционни фактори с вече установена експресия в човешки дорзален палиум – Sox2 и Pax6.
4. Осъществяване на имунохистохимични оцветявания за транскрипционни фактори с неизвестна експресия в човешки дорзален палиум по време на развитието – Zbtb20.
5. Количествен и фенотипен анализ на клетките, позитивни за изследваните транскрипционни фактори.



### **3. Материал и методи**

#### **3.1. Обект на изследване**

Този научен проект е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. Д-р П. Стоянов”, Варна с протокол-решение №19 от 05.04.2012 г.

Изследвани бяха човешки ембриони и фетуси на възраст от 4 до 36 гестационни седмици (г.с.). За проучването се одобряват мъртви, спонтанно абортирани ембриони и плодове, както и изкуствено предизвикани аборти по медицински показания. Не е включен материал от аборти по желание.

Тъканен материал от ембриони и фетуси след спонтанни аборти преди 22 г.с. е взет след приключване на аборта и след получаване на писмено съгласие от майката (пациента). Тъканен материал от мъртъв плод след 22 г.с. е взет по време на аутопсия след получаване на писмено съгласие от майката (пациента).

В проучването включихме тъканни проби от 11 фетуси на възраст от 17 до 20-21 г.с.

#### **3.2. Обработка на тъканите**

В проучването са включени проби от краен мозък на ембриони и фетуси, при които не се установява невропатология. Послесмъртният интервал (времето от смъртта до фиксирането на тъканите) беше в границите между 30 минути и 13 часа. След вземането тъканните проби са фиксирани в 10% буфериран формалин или 4% параформалдехид за две седмици.

За стандартно хистологично изследване мозъчната тъкан след фиксация беше дехидратирана с 50-100% алкохол и включена в парафин. Серийни срези с дебелина 7  $\mu$ m бяха оцветени с хематоксилин-еозин и с крезил виолет.

За проучване и анализиране на герминативните зони и развитието на ембрионалната кора беше приложена имунофлуоресцентна техника. Фиксирани тъканни проби бяха поставени в 30% разтвор на захароза за криопротекция и замразени в О.С.Т. (Optimal Cutting Temperature) среда. Криосрези с дебелина 20  $\mu\text{m}$  бяха изготвени на криостат и промити за 5 минути в 10% разтвор на PBS. Антигенно възстановяване беше осъществено в 10mM цитратен буфер с рН 6 на 95°C в микровълнова печка (400 W) за три пъти по пет минути с междинно охлаждане до стайна температура. След трикратно промиване с 10% разтвор на PBS срезите се инкубираха с първично антитяло на 4°C за 24 часа. Използвани са поликлонални и моноклонални антитела срещу Sox2 (козе; 1:50, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, САЩ), Zbtb20 (заешко; 1:50; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, САЩ), Pax6 (заешко; 1:50; Wako, САЩ). За двойно маркиране посредством индиректния флуоресцентен метод, отново след промиване с 10% разтвор на PBS, са използвани вторични антитела, конюгирани със следните флуорохроми: AlexaFluor-488, -568, -647 (1:100; Invitrogen). Тъканните проби бяха инкубирани с тях за два часа на тъмно и при стайна температура. Ядрата на клетки бяха оцветени с 4',6-диамино-2-фенилиндол (DAPI) (Vector Laboratories). След трикратно промиване с 10% разтвор на PBS срезите бяха включени в смес от глицерол и PBS и покрити.

### **3.3. Анализ на препаратите**

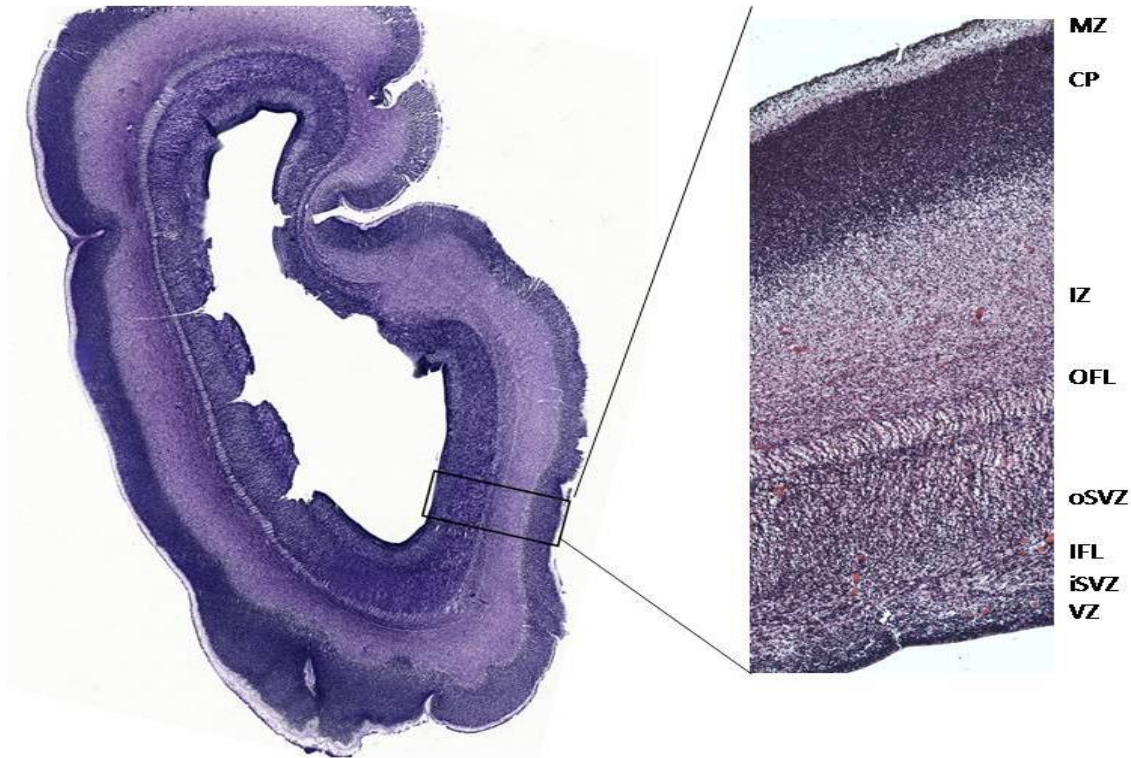
Анализът на препаратите беше осъществен с микроскоп Axio Imager Z2 Zeiss. С помощта на камера AxioCam MRc и система AxioVisioner в дигитални рамки в различни участъци бяха преброени маркираните клетки и разпределени в групи според експресията на транскрипционни фактори. За допълнителен анализ беше използван конфокален микроскоп Confocal Scanning System LSM 700 (Факултет по биология, Пловдивски университет).

### **3.4. Статистическа обработка**

Броят на позитивните за даден маркер клетки бе определен като брой клетки в дигитална рамка, като процент от общия брой клетки в дигиталната рамка или от клетки, позитивни за друг маркер от интерес. Осъществихме между пет и осем такива изброявания за всяка проучена от нас зона. Получените резултати бяха обработени и представени графично чрез функцията дескриптивна статистика на MS Excel 2010, като с бар беше посочена стандартната грешка в рамките на всяка група. За целите на сравнителния статистически анализ използвахме Т – тест Student's на същата програма (t-test: Two-Sample Assuming Equal Variances), който докладвахме чрез t- и p- величините му. Със \* означихме групите, за които доказахме статистически достоверна разлика с  $p \leq 0,05$ .

## 4. Резултати

На хистологични препарати, оцветени с хематоксилин-еозин и с крезил виолет, бяха идентифицирани отделните зони на пролиферация и миграция в развиващия се краен мозък (фиг.4.1).

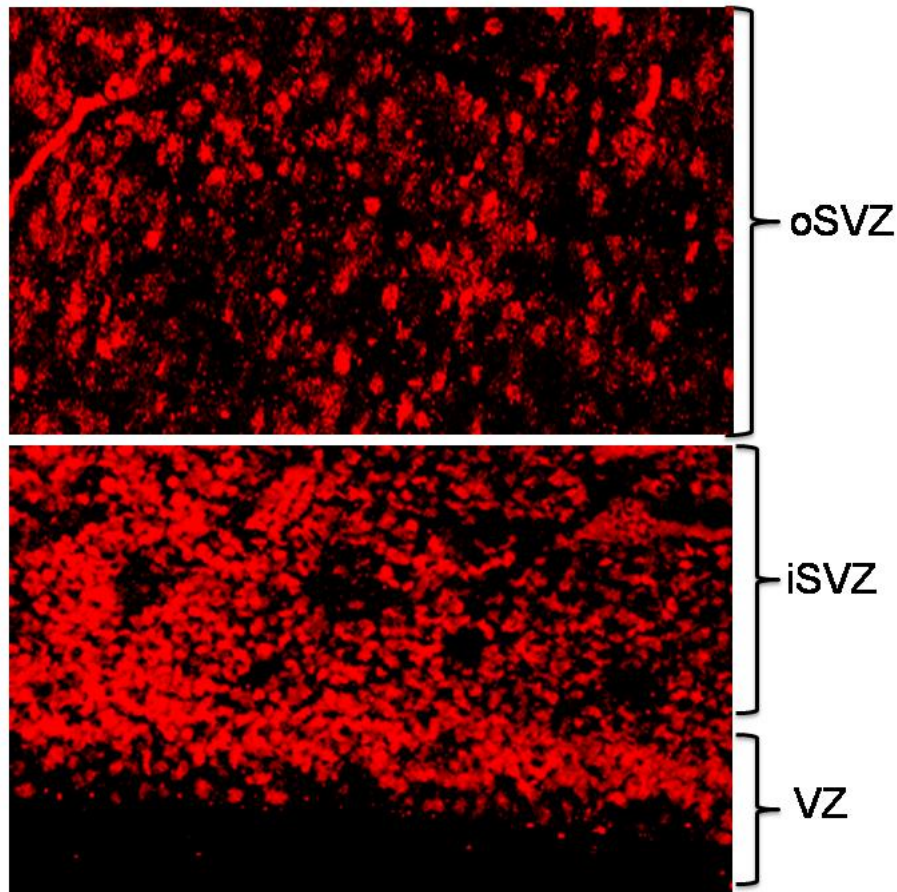


**Фиг.4.1.** Окципитален дял от човешки краен мозък през 17 г.с. Оцветяване с крезил виолет. VZ- вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона; IFL – вътрешен фиброзен слой; OFL външен фиброзен слой; IZ – междинна зона, CP – кортикална плочка, MZ – маргинална зона.

### 4.1. Гъстота на Zbtb20-експресиращите клетки

Изследвахме експресията на Zbtb20 в човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. Установихме такава само във VZ, iSVZ и oSVZ. Zbtb20 положителните клетки бяха отчетени дензитометрично (брой клетки на единица площ, броени в дигитална рамка). Гъстота на Zbtb20 положителните клетки се дефинира като брой клетки на квадратен  $\mu\text{m}^2$ . За удобство и за да работим с цели числа пресметнахме броя клетки на  $1 \text{ mm}^2$ .

Във фронтален дял през 20 г.с., рострално от ганглионните еминенции проучихме гъстотата на Zbtb20 положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ (фиг. 4.2).

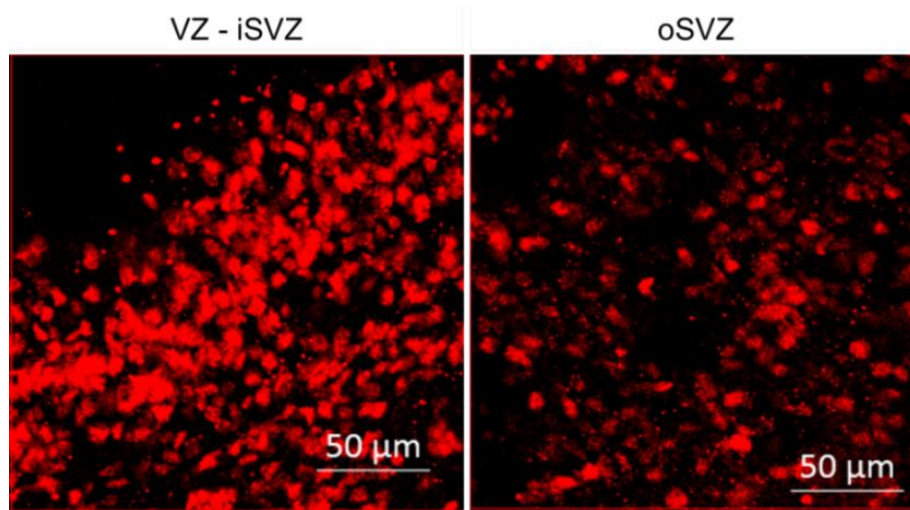


**Фиг. 4.2.** Експресия на Zbtb20 във фронтален дял (VZ, iSVZ и oSVZ) на човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. В червено - Zbtb20 позитивни клетки.

Във VZ установихме, че Zbtb20 положителните клетки са  $\sim 8400$  на  $1\text{mm}^2$ . Във iSVZ –  $\sim 9500$  на  $1\text{mm}^2$ , а във oSVZ –  $\sim 5300$  Zbtb20 положителни клетки на  $1\text{mm}^2$ . Допълнително чрез Т-тест установихме, че няма статистически значима разлика между броя клетки във VZ и iSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,5$ ), но отчетохме такава между тези две зони и oSVZ. Броят Zbtb20+ клетки на  $1\text{mm}^2$  във oSVZ е с 37% по-малък спрямо VZ ( $t=2,30$ ;

$p=0,014$ ). Разликата между гъстотата на тези клетки във iSVZ и oSVZ също беше достоверна при  $t=2,30$ ;  $p=0,02$ .

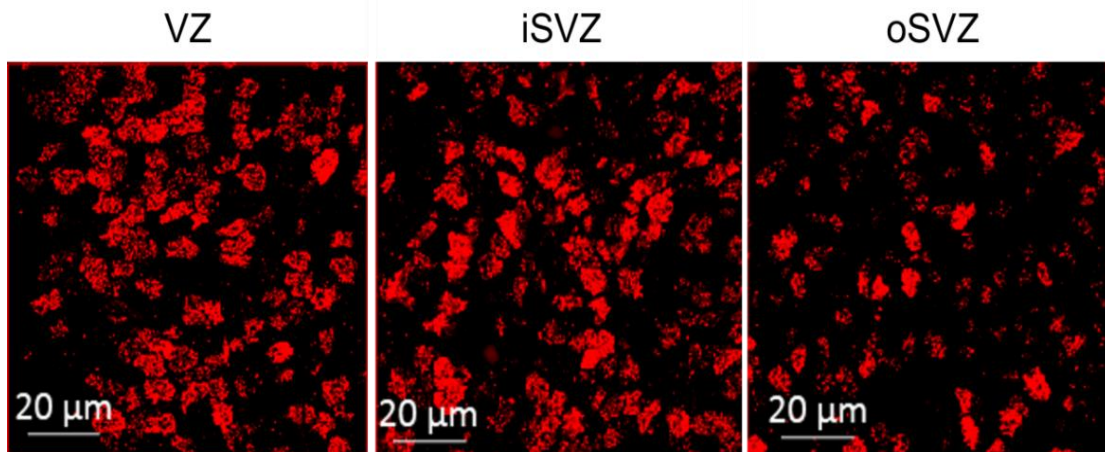
През същата 20 г.с. пак във фронтален дял, но на нивото на ганглионните еминенции получихме следните данни за гъстотата на Zbtb20 положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ: във VZ установихме, че Zbtb20 положителните клетки са  $\sim 9800$  на  $1 \text{ mm}^2$ ; във iSVZ –  $\sim 8400$  на  $1 \text{ mm}^2$ , а във oSVZ –  $\sim 6400$  Zbtb20 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  (фиг. 4.3).



**Фиг. 4.3.** Експресия на Zbtb20 във фронтален дял (VZ, iSVZ и oSVZ) на нивото на ЛГЕ и МГЕ. Човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. В червено - Zbtb20-позитивни клетки.

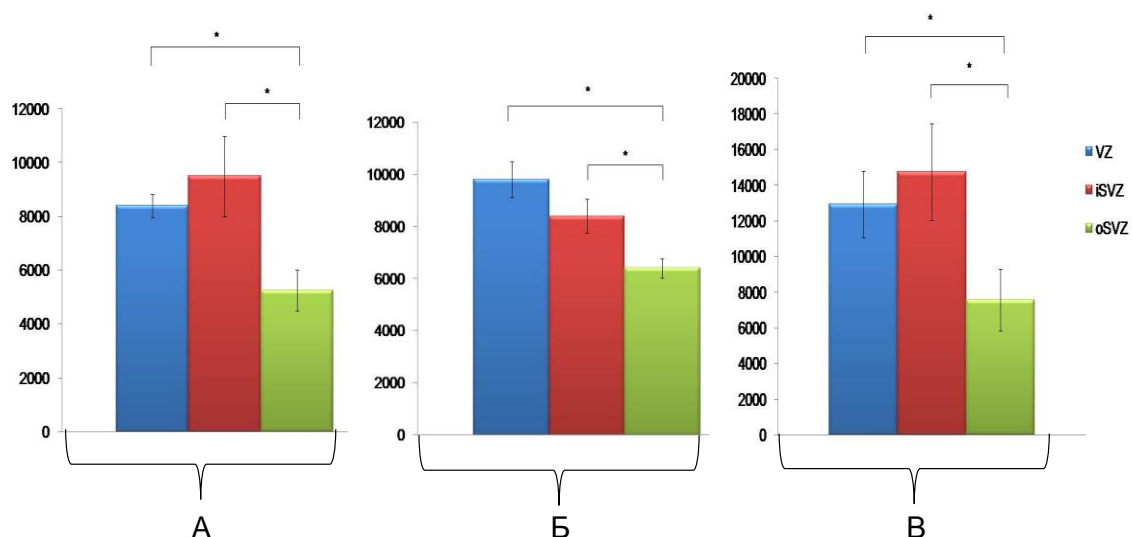
Анализът на данните показва липса на статистически значима разлика между броя клетки във VZ и iSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,30$ ), и значима такава между VZ и oSVZ ( $t=2,30$ ;  $p=0,02$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,30$ ;  $p=0,02$ ).

През 20 г.с. каудално от ганглионните еминенции, на ниво париетален дял, получихме следните резултати за гъстотата на Zbtb20 положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ: във VZ Zbtb20 положителните клетки бяха  $\sim 12925$  на  $1 \text{ mm}^2$ ; във iSVZ –  $\sim 14750$  на  $1 \text{ mm}^2$ , а във oSVZ –  $\sim 7583$  Zbtb20 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  (фиг. 4.4).



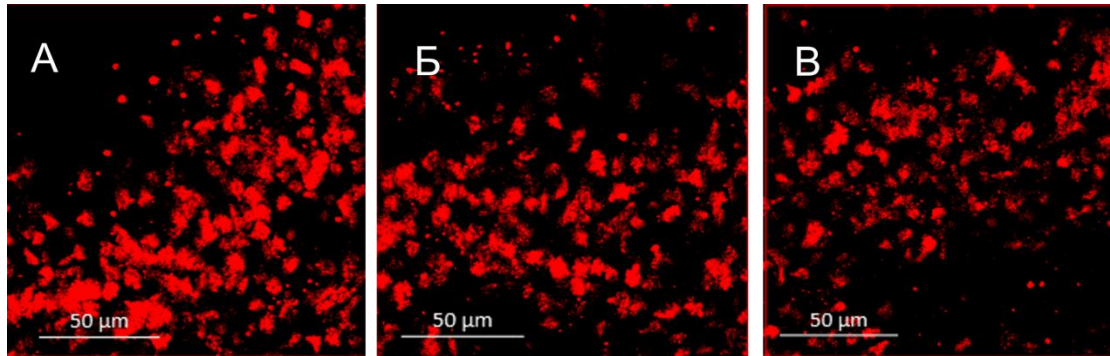
**Фиг. 4.4.** Експресия на *Zbtb20* в париетален дял (VZ, iSVZ и oSVZ), каудално от ЛГЕ и МГЕ. Човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. В червено - *Zbtb20* позитивни клетки.

Статистическата обработка на данните показва липса на достоверна разлика между VZ и iSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,59$ ) и потвърди по-малкия брой *Zbtb20* положителни клетки на единица площ във oSVZ. Разликата между VZ и oSVZ беше достоверна при  $t=2,30$  и  $p=0,04$ , както и тази между iSVZ и oSVZ при  $t=2,30$  и  $p=0,04$  (фиг. 4.5).



**Фиг. 4.5.** Брой *Zbtb20* положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ. А – рострално от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; Б – каудално от ганглионните еминенции. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

От така получените данни за експресията на Zbtb20 сравнихме гъстотата на положителните за този транскрипционен фактор клетки във VZ на феталния палиум през 20 г.с. роstralно, на нивото и каудално от ганглионните еминенции (фиг. 4.6).



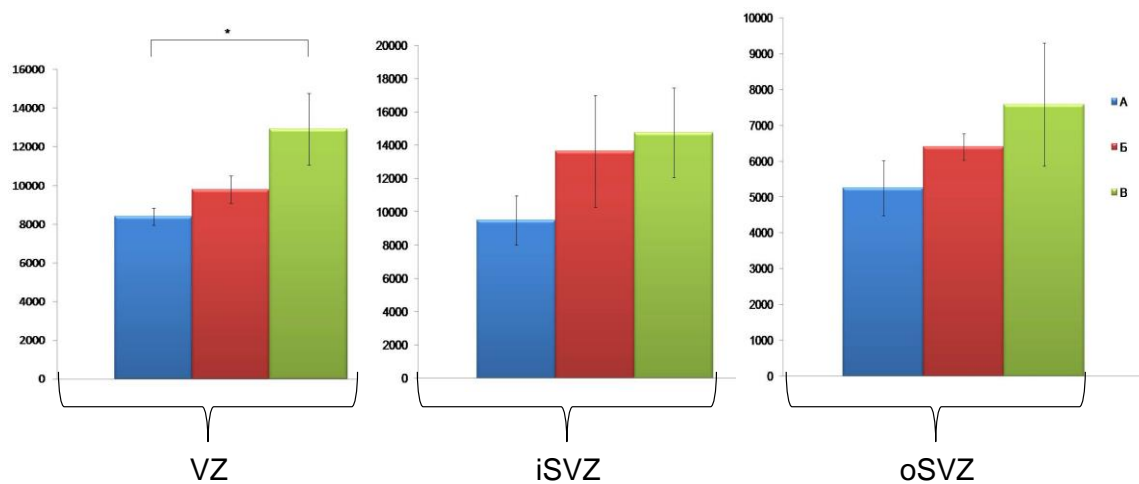
**Фиг. 4.6.** Zbtb20 положителни клетки във VZ на фетален палиум през 20 г.с. А – роstralно от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции.

При това сравнение отчетохме статистически значима промяна в гъстотата на Zbtb20 положителните клетки роstralно и каудално от ЛГЕ и МГЕ ( $t=2,44$ ;  $p=0,05$ ). Нямаше статистически достоверна разлика между стойностите роstralно и на нивото на ЛГЕ и МГЕ, както и между данните на нивото на еминенциите с тези каудално от тях ( $t=2,44$ ;  $p=0,16$ ).

Сравнявайки данните за iSVZ отчетохме увеличение в броя на Zbtb20 положителните клетки от роstralно към каудално (от  $\sim 9500$  до  $\sim 14750$  клетки на  $1 \text{ mm}^2$ ) но тази разлика не беше статистически значима ( $t=2,44$ ;  $p=0,8$ ).

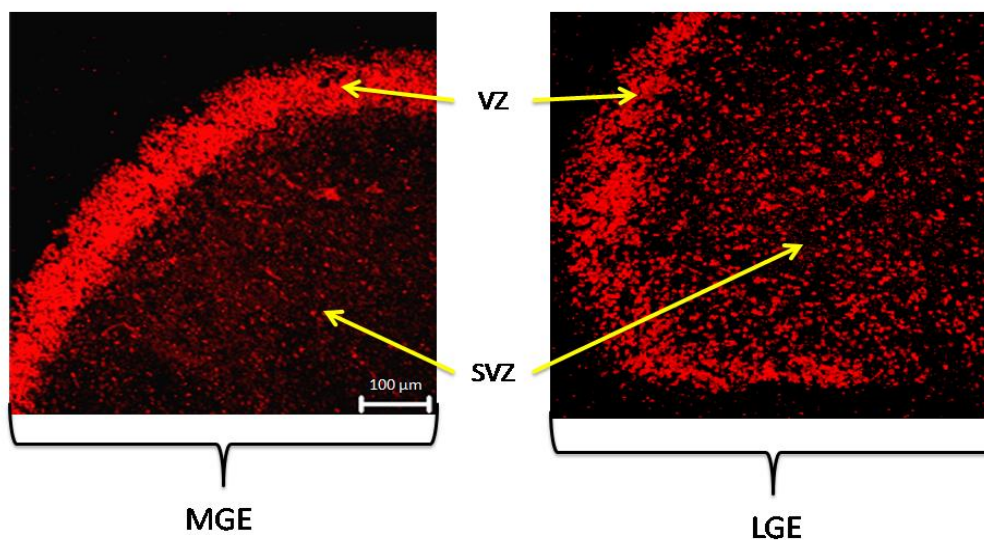
Аналогично подходихме и към данните за гъстотата на Zbtb20+ клетки във oSVZ, за които, въпреки отчетените малко по-високи стойности на нивото и каудално от ганглионните еминенции, статистическият анализ не показва достоверна разлика ( $t=2,30$ ;  $p=0,5$ ) (фиг. 4.7).





**Фиг. 4.7.** Брой *Zbtb20* положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във *VZ*, *iSVZ* и *oSVZ*. А – рostrално от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. (\*  $p \leq 0,05$ ). *VZ* – вентрикулна зона; *iSVZ* – вътрешна субвентрикулна зона; *oSVZ* – външна субвентрикулна зона.

Като следваща наша стъпка изследвахме експресията на *Zbtb20* в медиалната и латералната ганглионни еминенции (МГЕ и ЛГЕ), като сравнихме гъстотата на *Zbtb20* положителните клетки във *VZ* и *SVZ* (фиг. 4.8).

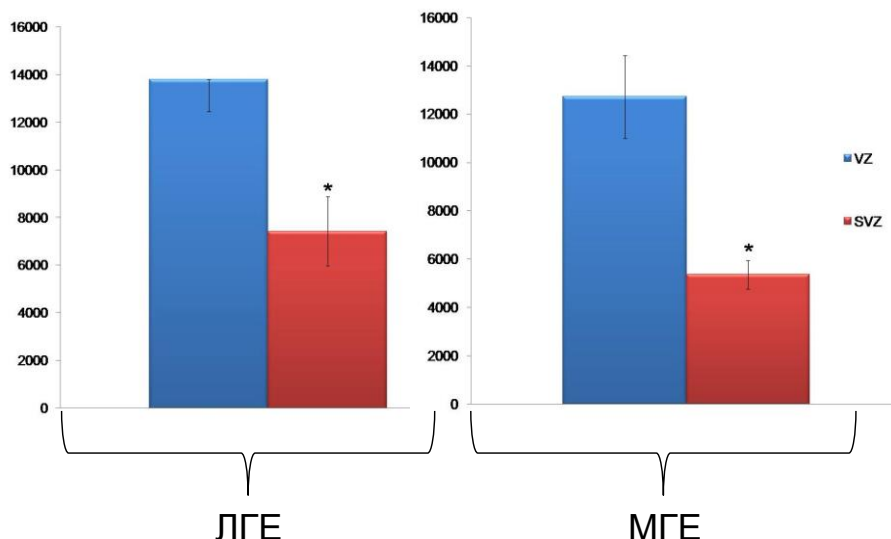


**Фиг. 4.8.** Експресия на *Zbtb20* в ганглионни еминенции (*VZ* и *SVZ*) на човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. В червено - *Zbtb20* позитивни клетки.

За ЛГЕ получихме следните данни: във *VZ* *Zbtb20* положителните клетки бяха  $\sim 13780$  на  $1 \text{ mm}^2$ , а във *SVZ* –  $\sim 7425$  на  $1 \text{ mm}^2$ . Чрез Т-тест

установихме статистически значима разлика между двете зони ( $t=2,30$ ;  $p=0,014$ ), като  $Zbtb20+$  клетки на  $1\text{ mm}^2$  бяха с 46% по-малко на във  $oSVZ$ .

В МГЕ гъстотата на  $Zbtb20$  положителните клетки във  $VZ$  беше  $\sim 12716$  на  $1\text{ mm}^2$ , а във  $SVZ$  –  $\sim 5360$  на  $1\text{ mm}^2$ . Анализът на данните показва значима разлика между двете зони с  $t=2,26$  и  $p=0,004$  (фиг. 4.9).

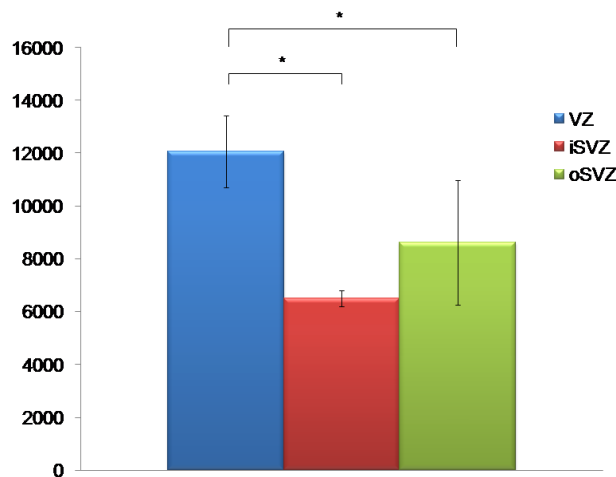


**Фиг. 4.9.** Брой  $Zbtb20$  положителни клетки на  $1\text{ mm}^2$  във  $VZ$  и  $SVZ$  на ЛГЕ и МГЕ. Човешки фетален теленцефалон, 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ).

Сравнихме гъстотата на  $Zbtb20$  положителните клетки във  $VZ$  на латералната и медиална ганглионна еминенция. Статистическият анализ показва липса на значима разлика между двете еминенции ( $t=2,22$ ;  $p=0,64$ ). Същото направихме и по отношение на  $SVZ$ . И по отношение на тази зона направеният от нас анализ (Т-тест) не показва статистически значима разлика между двете ганглионни еминенции ( $t=2,36$ ;  $p=0,19$ ), въпреки отново по-високите стойности в ЛГЕ.

За да допълним така получените данни, изследвахме експресията на  $Zbtb20$  в окципитален дял през 17 г.с.  $Zbtb20$  положителни клетки установихме отново само в трите герминативни зони  $VZ$ ,  $iSVZ$  и  $oSVZ$ . Във  $VZ$  установихме, че  $Zbtb20$  положителните клетки са  $\sim 12075$  на  $1\text{ mm}^2$ . Във  $iSVZ$  –  $\sim 6500$  на  $1\text{ mm}^2$ , а във  $oSVZ$  –  $\sim 8628$   $Zbtb20$  положителни

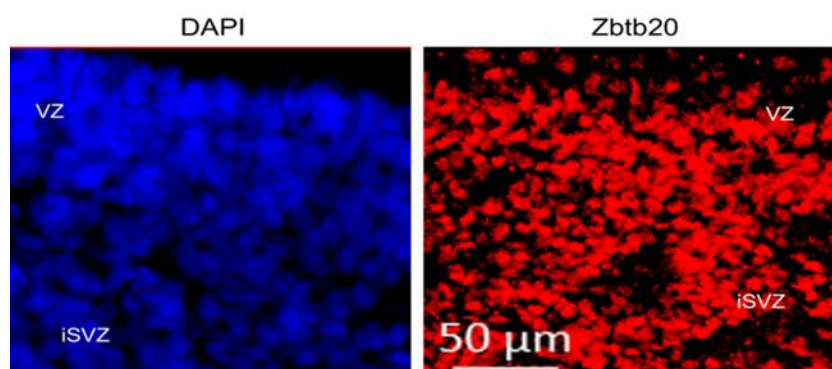
клеткина  $1 \text{ mm}^2$ . Разликата между VZ и iSVZ беше статистически значима при  $t=2,57$  и  $p=0,05$ . Такава беше и между VZ и oSVZ с  $t=2,36$  и  $p=0,01$ , докато тази между iSVZ и oSVZ не беше достоверна при  $t=2,36$  и  $p=0,66$  (фиг. 4.10).



**Фиг. 4.10.** Брой *Zbtb20* положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ в окципитален дял на човешки фетален теленцефалон през 17 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

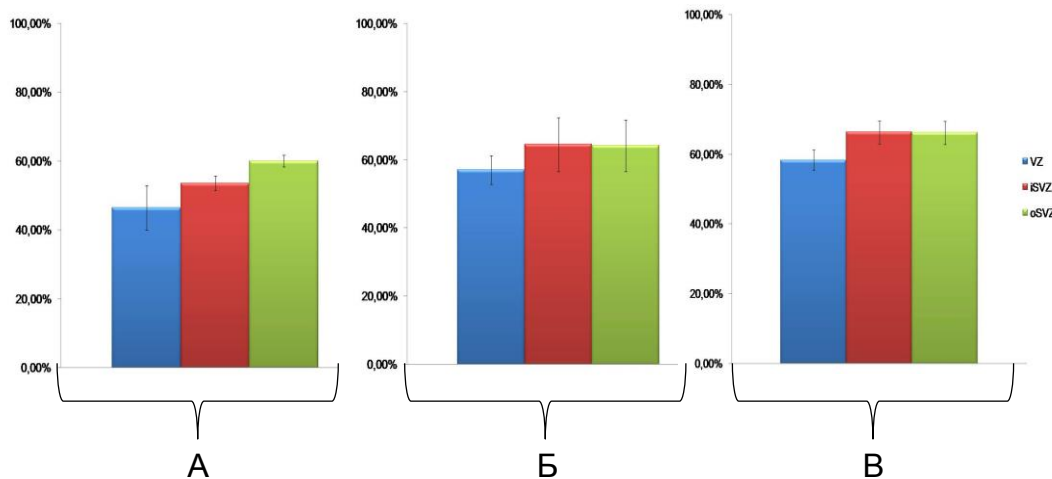
#### 4.2. Дял на *Zbtb20* експресиращите клетки от всички прогенитори

Във всички изследвани региони и зони изчислихме в проценти броя *Zbtb20* положителни клетки спрямо всички прогенитори, визуализирани чрез DAPI-позитивни клетъчни ядра (фиг. 4.11).



**Фиг. 4.11.** Визуализирани чрез DAPI клетъчни ядра (синьо) и експресия на *Zbtb20* (червено) във VZ и iSVZ във фронтален дял на човешки теленцефалон през 20 г.с.

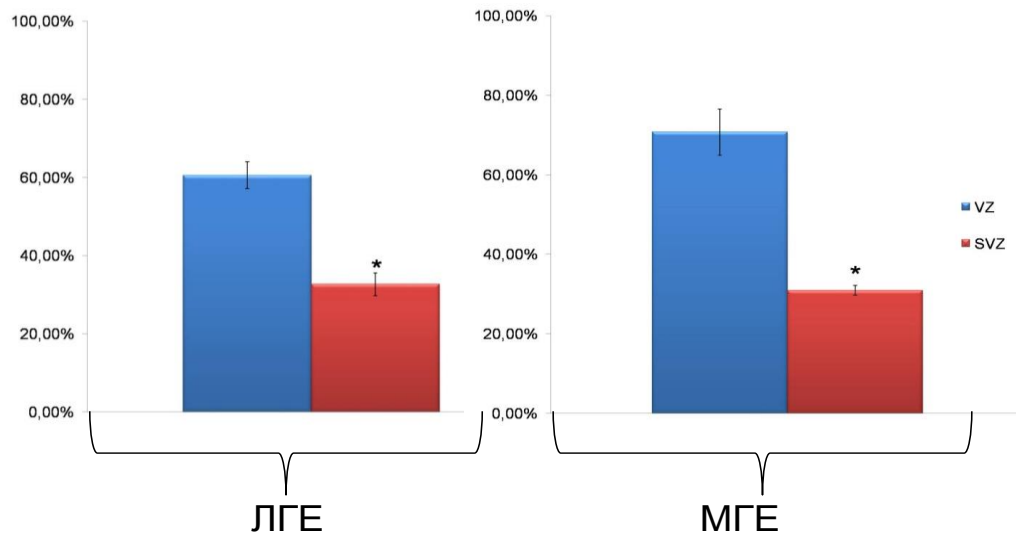
Във фронтален дял, рострално от каудалните еминенции, през 20 г.с. нашите резултати показаха, че дялът на Zbtb20+ клетки се увеличава от ~46,5% във VZ, през ~53,61% във iSVZ до ~60,09% във oSVZ. При статистическия анализ тази разлика беше отчетена като недостоверна ( $t=4,30$ ;  $p=0,1$ ). На нивото на ганглионните еминенции съотношението Zbtb20+ клетки спрямо визуализираните с DAPI клетъчни ядра беше отчетено като ~57,11% Zbtb20+ клетки във VZ и почти еднакъв процент Zbtb20+ клетки във iSVZ и oSVZ – съответно ~64,52% и ~64,19%. Т-тест анализ потвърди липсата на значима разлика между трите герминативни зони ( $t=4,30$ ;  $p=0,5$ ). Каудално от ганглионните еминенции в париетален дял на фетален теленцефалон през 20 г.с. получихме следните данни за дела на Zbtb20+ клетки: във VZ отчетохме ~58,31% Zbtb20+ клетки спрямо маркираните с DAPI клетъчни ядра, във iSVZ – ~66,32%, а във oSVZ – ~66,14%. Разликата между отделните зони не беше статистически значима при  $t=3,18$ ;  $p=0,7$  ( фиг. 4.12)



**Фиг. 4.12.** Процент Zbtb20 положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра във VZ, iSVZ и oSVZ.. А – рострално от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

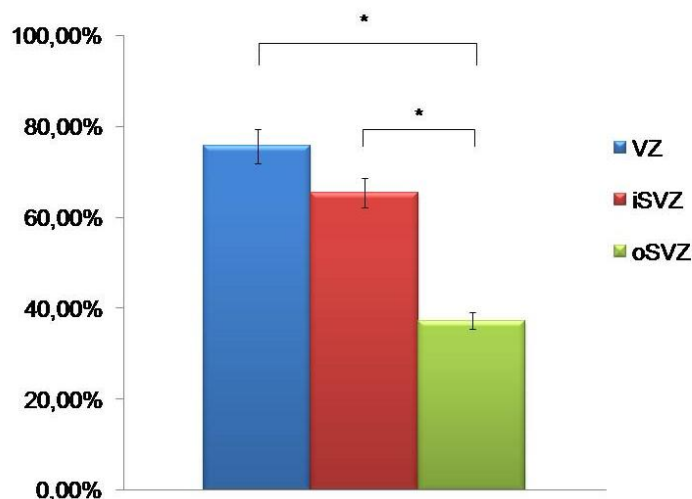
Проучихме процентния дял на Zbtb20+ клетки в двете ганглионни еминенции през 20 г.с. Във VZ на ЛГЕ ~60,60% от клетките експресираха

този транскрипционен фактор, а в SVZ този дял беше ~32,67%. Статистическият анализ доказва достоверна разлика между двете при  $t=3,18$  и  $p=0,01$ . В рамките на МГЕ ~70,75% от клетките във VZ бяха Zbtb20+ и съответно ~30,95% в SVZ. Тази разлика беше доказана като статистически значима при  $t=3,18$  и  $p=0,01$  (фиг. 4.13)



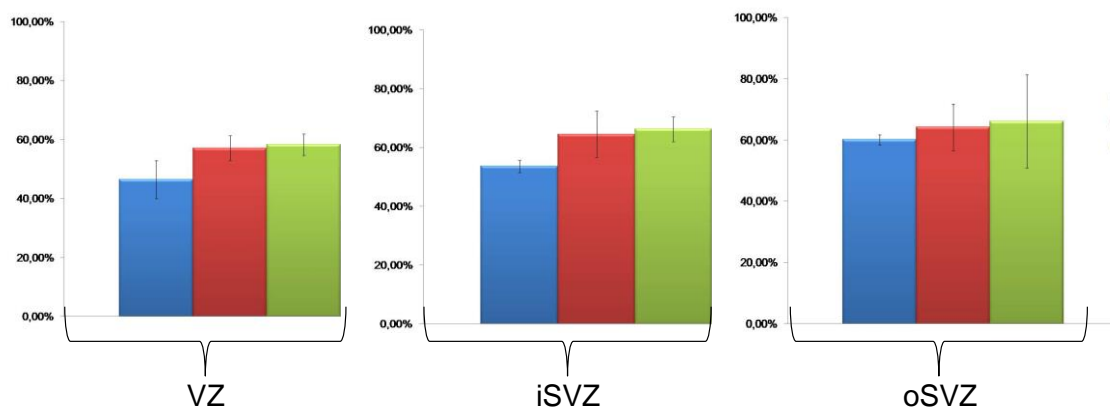
**Фиг. 4.13.** Процент Zbtb20 положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра във VZ и SVZ на ЛГЕ и МГЕ. Човешки фетален теленцефалон, 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ).

Нашето проучване в окципитален дял на фетален теленцефалон през 17 г.с. показва ~75,71% Zbtb20+ клетки във VZ, ~65,39% - във iSVZ и ~37,33% - във oSVZ като процент от всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра. Статистическият анализ доказва достоверна разлика между VZ и oSVZ ( $t=4,30; p=0,005$ ), между iSVZ и oSVZ ( $t=4,30; p=0,005$ ), и същевременно липса на значими различия между VZ и iSVZ ( $t=4,30; p=0,91$ ) (фиг. 4.14).



**Фиг. 4.14.** Процент *Zbtb20* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра във VZ, iSVZ и oSVZ в окципитален дял през 17 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Сравнихме получените от нас данни за процента експресиращи *Zbtb20* клетки по зони и по региони. През 20 г.с. във VZ дялът на *Zbtb20*+ клетки беше по-висок на нивото и каудално от ганглионните еминенции, като стойностите бяха близки – съответно по ~57,11% и ~58,31%. Рострално от ЛГЕ и МГЕ този дял беше ~46,50%. Тази разлика не беше отчетена като статистически достоверна ( $t=3,18$ ;  $p=0,2$ ). Дялът на *Zbtb20*+ клетки във iSVZ рострално от ганглионните еминенции беше най-малък – ~53,63%, на нивото на ЛГЕ – МГЕ и каудално от тях имаше близка, малко по-голяма стойност – съответно ~64,52% и ~66,32%. Тези разлики не бяха статистически достоверни при направения Т-тест ( $t=3,18$ ;  $p=0,1$ ). Сравнихме процента *Zbtb20*+ клетки от всички маркирани с DAPI клетъчни ядра и в oSVZ. Стойностите рострално, на нивото на еминенциите и каудално от тях бяха близки – съответно ~60,10%, ~64,19% и ~66,14%. Липсата на значима разлика в дела на *Zbtb20*+ клетки на нивото на тази герминативна зона по ростро-каудалната ос беше потвърдена и от статистическия анализ при  $t=3,18$  и  $p=0,27$  (фиг. 4.15).



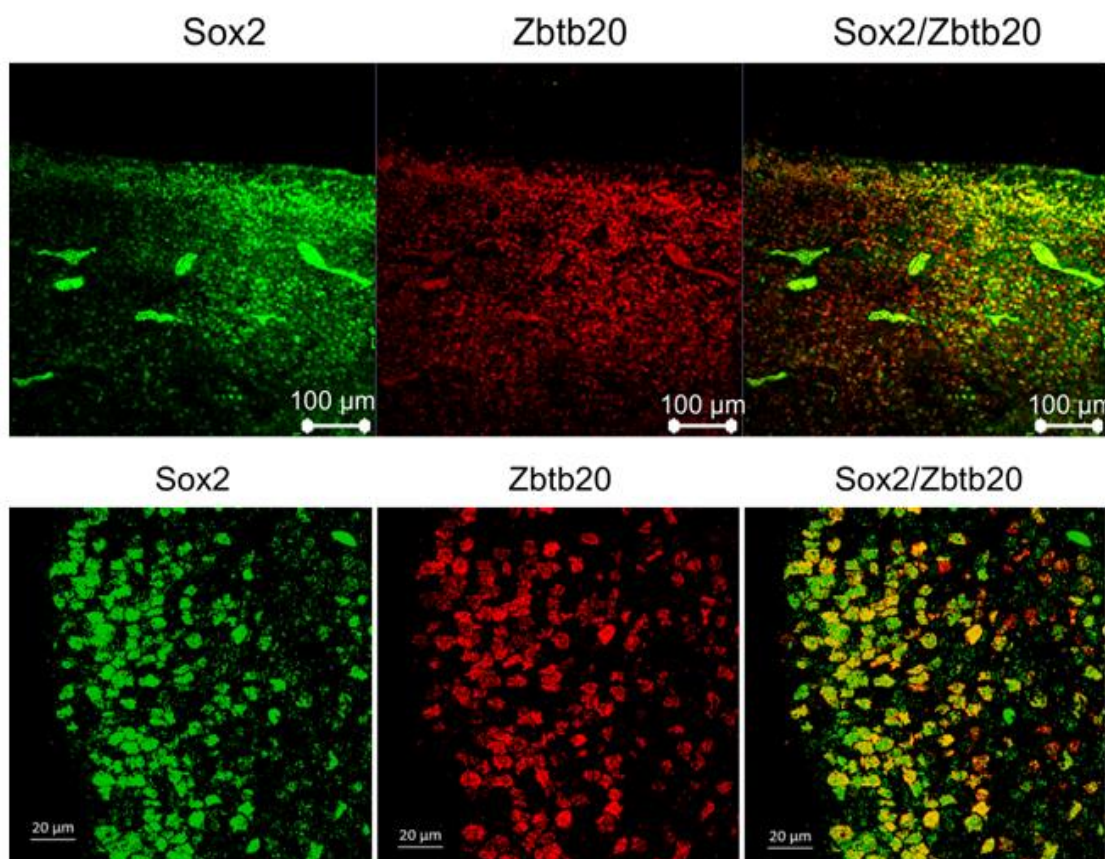
**Фиг. 4.15.** Процент *Zbtb20* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра във VZ, iSVZ и oSVZ през 20 г.с. А – роstralно от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Сравнихме процента експресиращи *Zbtb20* клетки във VZ на ЛГЕ и МГЕ и не отчетохме статистически значима разлика ( $t=2,77$ ;  $p=0,2$ ) между двете еминенции. Сравнението между SVZ на еминенциите също не показва разлика между ЛГЕ и МГЕ ( $t=4,30$ ;  $p=0,64$ ).

### 4.3. Ко-локализация на *Zbtb20* и *Sox2*

Допълнително в изследваните региони проучихме ко-локализацията на *Zbtb20* и *Sox2*, утвърден маркер за базални и апикални радиални глиални прогенитори, като за целта използвахме конфокална микроскопия.

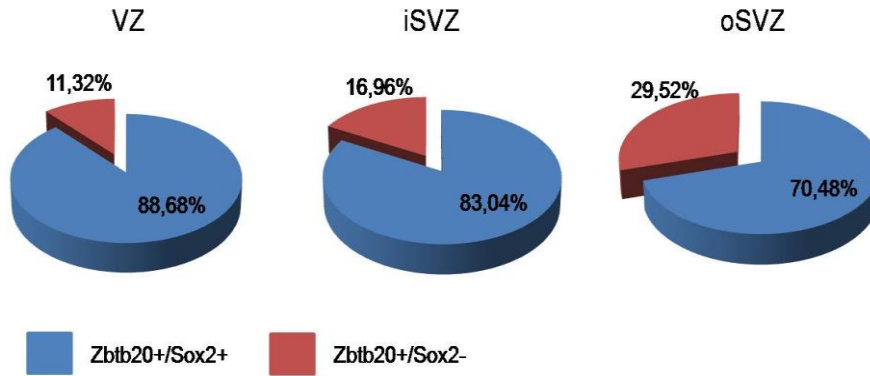
През 20 г.с. изследвахме ко-локализацията на *Zbtb20* и *Sox2* в развиващия се кортекс и в ганглионните еминенции. Проучихме VZ, iSVZ и oSVZ на феталния палиум (фиг. 4.16).



**Фиг. 4.16.** Експресия на *Zbtb20* и *Sox2* във фронтален дял на човешки фетален теленцефалон през 20 г.с.

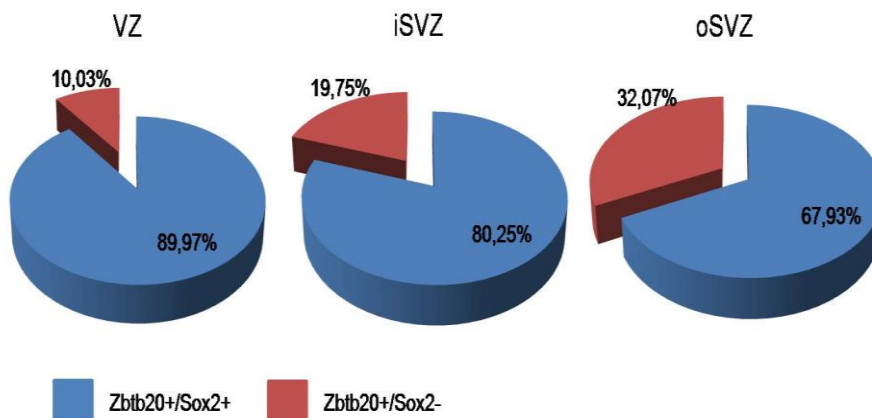
Определихме броя на клетките позитивни едновременно и за двата транскрипционни фактора и техния дял от всички *Zbtb20*+ клетки в тези зони. Във фронтален дял, роstralно от МГЕ и ЛГЕ, този дял беше висок и в трите герминативни зони, като във VZ  $88,68\% \pm 2,73\%$  от *Zbtb20*+ клетки експресират и *Sox2*. Във iSVZ този процент беше  $83,08\% \pm 3,82\%$ . Във oSVZ  $70,48\% \pm 5,65\%$  от *Zbtb20* положителните клетки експресираха и *Sox2* (фиг. 4.17). Нямаше статистически значима разлика между дела на двойно позитивните клетки в трите зони ( $t=2,77$ ;  $p=0,1$ ).





**Фиг. 4.17.** Дял на Sox2 експресиращите клетки от всички Zbtb20 положителни клетки във фронтален дял, рострално от МГЕ и ЛГЕ през 20 г.с.

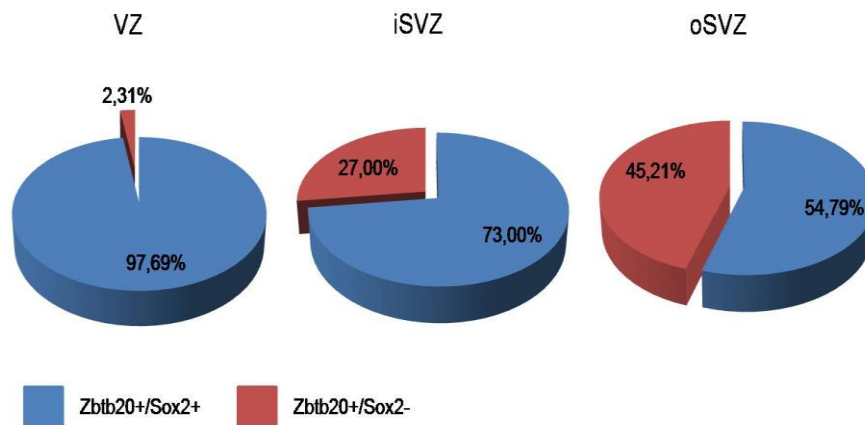
Във фронтален дял, на нивото на МГЕ и ЛГЕ,  $89,97\% \pm 4,58\%$  от Zbtb20 положителните клетки във VZ експресираща и Sox2. Във iSVZ този процент беше  $80,25\% \pm 3,33\%$ , а във oSVZ  $67,93\% \pm 3,91\%$  (фиг. 4.18). Разликата в дела на двойно позитивните клетки във VZ и oSVZ беше статистически достоверна при  $t=2,77$  и  $p=0,02$ . Между VZ и iSVZ, както и между iSVZ и oSVZ липсваше такава ( $t=4,30$ ;  $p=0,22$  и  $t=2,77$ ;  $p=0,11$ ).



**Фиг. 4.18.** Дял на Sox2 експресиращите клетки от всички Zbtb20 положителни клетки във фронтален дял, на нивото на МГЕ и ЛГЕ през 20 г.с.

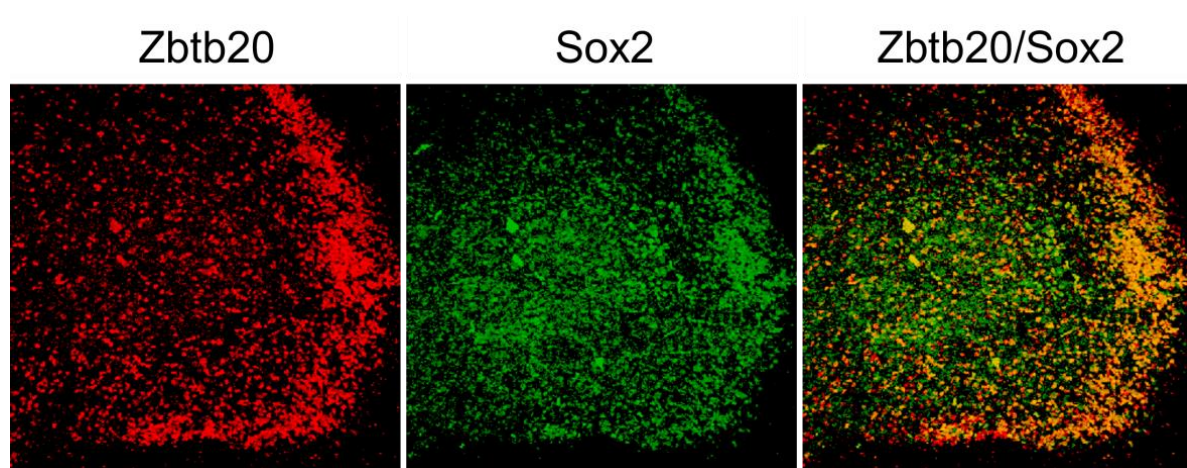
В париетален дял, каудално от МГЕ и ЛГЕ,  $97,69\% \pm 2,31\%$  от Zbtb20+ клетки във VZ експресираща и Sox2. Във iSVZ този дял беше  $73,00\%$

$\pm 13,95\%$ , а във  $\text{oSVZ}$  –  $54,79\% \pm 1,46\%$  (фиг. 4.19). Сравнявайки  $\text{VZ}$  и  $\text{iSVZ}$  не отчетохме статистически значима разлика между тях по този показател ( $t=4,30$ ;  $p=0,22$ ). Такава нямаше и между  $\text{iSVZ}$  и  $\text{oSVZ}$  ( $t=4,30$ ;  $p=0,32$ ). Установихме статистически значима разлика само между  $\text{VZ}$  и  $\text{oSVZ}$  при  $t=4,30$ ;  $p=0,004$ .



**Фиг. 4.19.** Дял на *Sox2* експресиращите клетки от всички *Zbtb20* положителни клетки в париетален дял, каудално от МГЕ и ЛГЕ през 20 г.с.

Във всяка от ганглионните еминенции сравнихме фракциите на  $\text{Zbtb20+}/\text{Sox2+}$  клетки като процент от всички  $\text{Zbtb20+}$  клетки във  $\text{VZ}$  и  $\text{SVZ}$  (фиг. 4.20).



**Фиг. 4.20.** Експресия на *Zbtb20* и *Sox2* в латералната ганглионна еминенция на човешки фетален теленцефалон през 20 г.с.

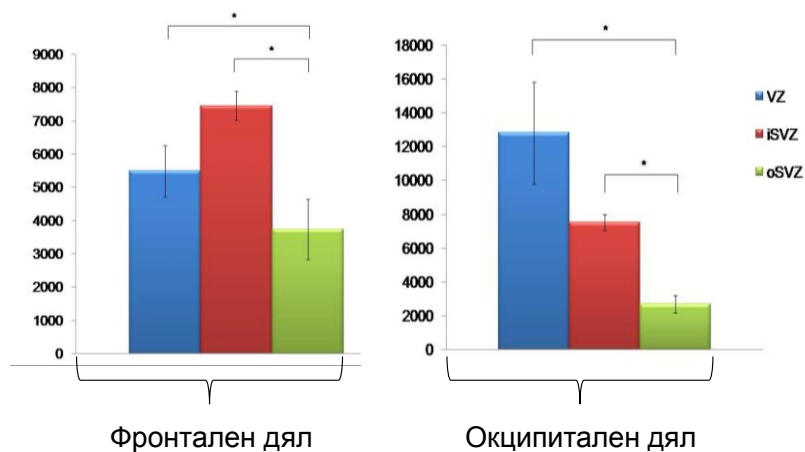
В ЛГЕ във VZ установихме, че  $93,86\% \pm 1,06\%$  от Zbtb20+ клетки експресират и Sox2. В SVZ двойно позитивни са  $86,47\% \pm 6,21\%$  от всички Zbtb20+ клетки. В МГЕ също установихме висок процент Sox2+клетки сред популацията на Zbtb20+ клетки във VZ –  $89,73\% \pm 4,23\%$ . Двойно позитивните клетки във SVZ бяха  $91,14\% \pm 2,40\%$ . Сравнявайки дяловете Zbtb20+/Sox2+ клетки в двете ганглионни еминенции, не открихме статистически значима разлика между вентрикулна и субвентрикулна зона в рамките на всяка, както и между двете еминенции ( $t=2,77$ ;  $p=0,68$ ).

#### 4.4. Гъстота на Sox2експресиращи клетки

Изследвахме експресията на Sox2 в човешки фетален теленцефалон през 17 г.с. във фронтален и в окципитален дял. Установихме позитивни за този транскрипционен фактор клетки само във вентрикулната, вътрешна и външна субвентрикулна зона. Sox2 положителните клетки бяха отчетени като брой в дигитална рамка. За целите на сравнителния анализ и заради различната площ на проучваните зони, отново използвахме параметъра гъстота на Sox2 положителните клетки, който се дефинира като брой клетки на квадратен  $\mu\text{m}^2$ . За удобство и за да работим с цели числа пресметнахме броя клетки на  $1 \text{ mm}^2$ .

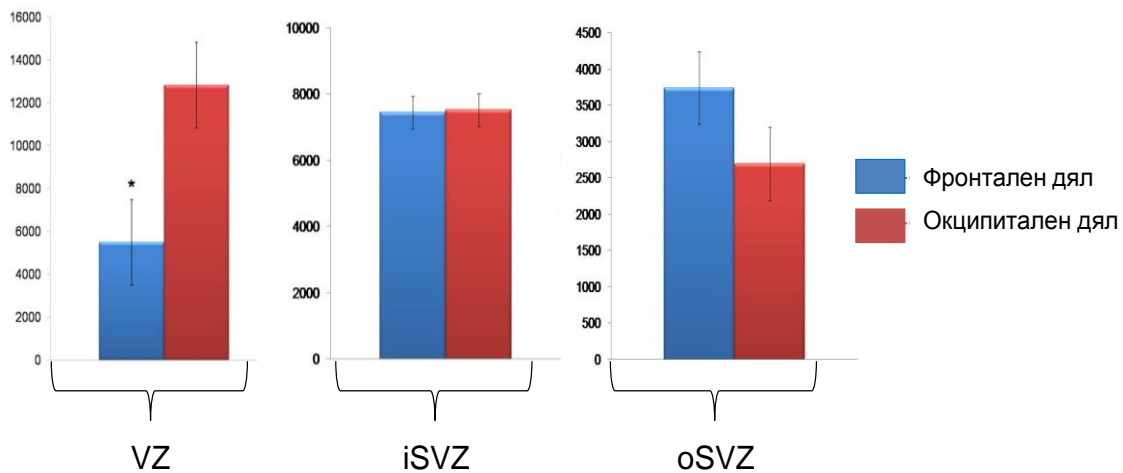
Във фронтален дял през 17 г.с. гъстотата на Sox2 положителните клетки беше  $\sim 5488$  клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ,  $\sim 7450$  във iSVZ и  $\sim 3737$  клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във oSVZ. Статистическият анализ показва липса на достоверна разлика между VZ и iSVZ ( $t=2,20$ ;  $p=0,13$ ) и статистически значима такава между VZ и oSVZ ( $t=2,57$ ;  $p=0,009$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,22$ ;  $p=0,0008$ ). В окципиталния дял броят Sox2 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ беше  $\sim 12816$ , във iSVZ -  $\sim 7525$ . а във oSVZ –  $\sim 2694$  Sox2 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$ . Статистическият анализ

определи като достоверна разликата между VZ и oSVZ ( $t=2,16$ ;  $p=0,001$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,20$ ;  $p=0,0001$ ) (фиг. 4.21).



**Фиг. 4.21.** Брой Sox2 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ във фронтален и окципитален дял на човешки фетален теленцефалон през 17 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

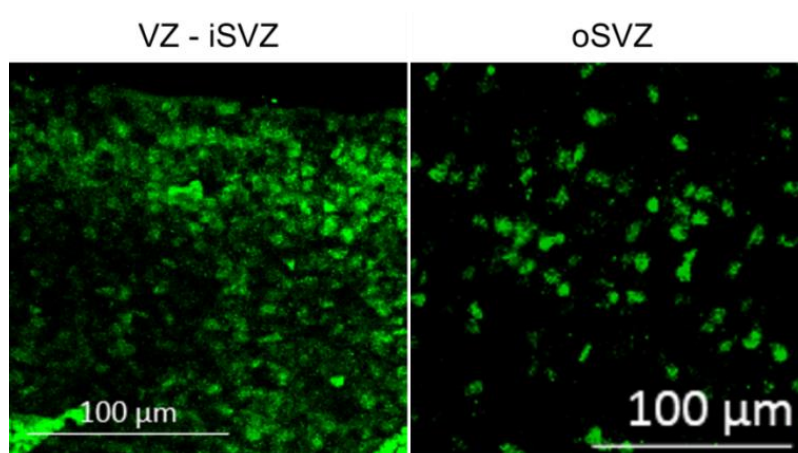
Сравнихме гъстотата по зони в двата дяла. По отношение на VZ доказахме статистически достоверна разлика между двата дяла при  $t=2,16$  и  $p=0,01$ . Сравнихме гъстотата на Sox2 положителните клетки във iSVZ на фронталния и окципиталния дял, при което не отчетохме статистически значима разлика между тях ( $t=2,44$ ;  $p=0,9$ ). Аналогично подходихме и спрямо данните за гъстотата на Sox2 положителните клетки във oSVZ. На нивото на тази зона не установихме статистически значима разлика между двата дяла ( $t=2,22$ ;  $p=0,34$ ) (фиг. 4.22).



**Фиг. 4.22.** Брой *Sox2* положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ във фронтален и окципитален дял на човешки фетален теленцефалон през 17 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Допълнихме нашите данни, като изследвахме експресията на *Sox2* през 20 г.с. И през този период *Sox2* положителните клетки бяха локализирани само в герминативните вентрикулна, вътрешна и външна субвентрикулна зони.

Във фронтален дял през тази гестационна седмица, рострално от ганглионните еминенции, проучихме гъстотата на *Sox2* положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ (фиг. 4.23).

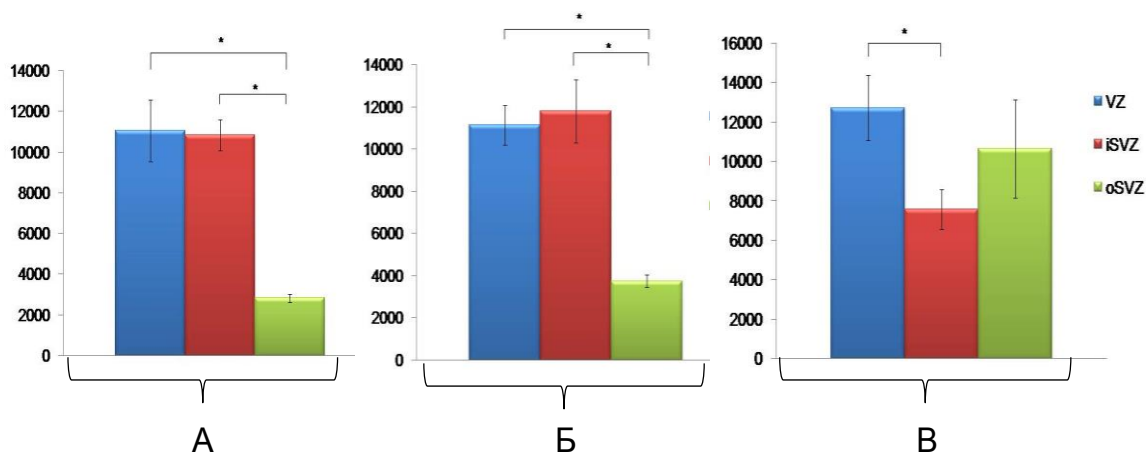


**Фиг. 4.23.** Експресия на *Sox2* (в зелено) във VZ, iSVZ и oSVZ. Фронтален дял, рострално от ЛГЕ и МГЕ през 20 г.с.

Във VZ установихме, че Sox2 положителните клетки са  $\sim 11040$  на  $1\text{ mm}^2$ , във iSVZ –  $\sim 10840$  на  $1\text{ mm}^2$ , а във oSVZ –  $\sim 2828$  Sox2 положителни клетки на  $1\text{ mm}^2$ . Чрез T-тест доказахме статистически достоверна разлика между VZ и oSVZ ( $t=2,77$ ;  $p=0,001$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,77$ ;  $p=0,006$ ). Не установихме разлика между VZ и iSVZ ( $t=2,30$ ;  $p=0,9$ ).

Също през 20 г.с., отново във фронтален дял, но на нивото на ганглионните еминенции получихме следните данни за гъстотата на Sox2 положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ:  $\sim 11140$  Sox2 положителни клетки във VZ и съответно по  $\sim 11800$  и  $\sim 3743$  Sox2 положителни клетки във iSVZ и oSVZ на  $1\text{ mm}^2$ . Използвайки T-тест за статистически анализ потвърдихме близките стойности във VZ и iSVZ и липсата на значима разлика между тях ( $t=2,30$ ;  $p=0,7$ ). Разликата в гъстотата на Sox2 положителните клетки във VZ и oSVZ беше статистически достоверна при  $t=2,77$  и  $p=0,0006$ . Анализът потвърди и разликата в гъстотата между iSVZ и oSVZ ( $t=2,77$ ;  $p=0,001$ ).

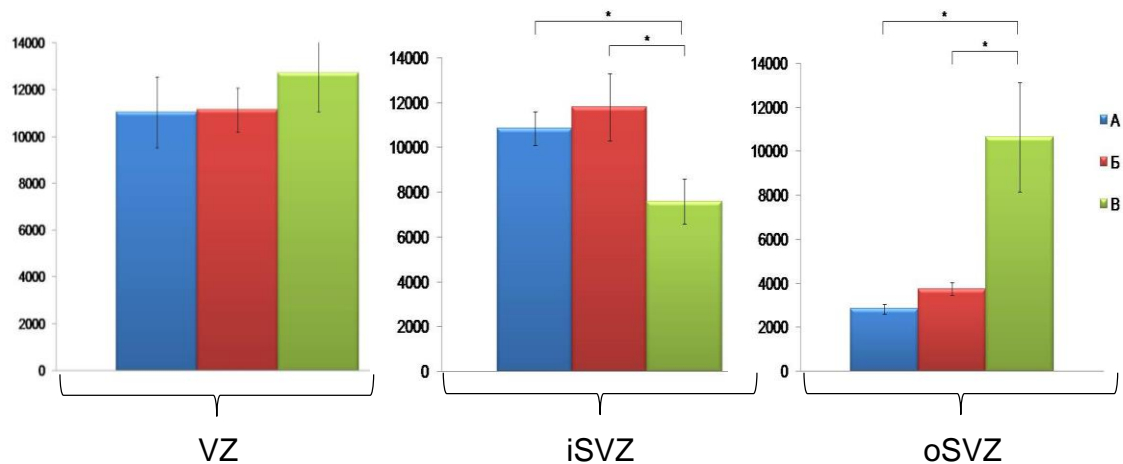
През 20 г.с. каудално от ганглионните еминенции, на ниво париетален дял, получихме следните резултати за гъстотата на Sox2 положителните клетки във VZ, iSVZ и oSVZ. Във VZ Sox2 положителните клетки бяха  $\sim 12720$  на  $1\text{ mm}^2$ , във iSVZ –  $\sim 7582$  на  $1\text{ mm}^2$ , а във oSVZ –  $\sim 10650$  Sox2 положителни клетки на  $1\text{ mm}^2$ . Чрез T-тест доказахме статистически достоверна разлика между VZ и iSVZ ( $t=2,30$ ;  $p=0,02$ ). Не открихме такава разлика между VZ и oSVZ ( $t=2,26$ ;  $p=0,5$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,26$ ;  $p=0,31$ ) (фиг. 4.24).



**Фиг. 4.24.** Брой *Sox2* положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ в човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). А – роstralно от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

От така получените данни за експресията на *Sox2* сравнихме гъстотата на положителните за този транскрипционен фактор клетки във VZ на феталния палиум през 20 г.с. роstralно, на нивото и каудално от ганглионните еминенции. При това сравнение отчетохме промяна във гъстотата на *Sox2*+ клетки с нарастване от роstralно към каудално, съответно от ~11040 до ~12720 клетки на  $1 \text{ mm}^2$ . Тази разлика не беше статистически значима между роstralната част на фронталния дял и париеталния дял, каудално от ганглионните еминенции ( $t=2,30$ ;  $p=0,47$ ); както и между фронталния дял на нивото на ЛГЕ и МГЕ и париеталния дял ( $t=2,30$ ;  $p=0,42$ ). В рамките на iSVZ отчетохме статистически значимо намаление в броя на *Sox2* позитивните клетки на единица площ роstralно от еминенциите и каудално от тях ( $t=2,30$ ;  $p=0,03$ ). Такова статистически достоверно намаление доказахме също между нивото на ганглионните еминенции и каудално от тях ( $t=2,30$ ;  $p=0,04$ ). Разликата в броя на *Sox2* позитивните клетки на единица площ във iSVZ роstralно от еминенциите и във iSVZ на тяхното ниво не беше статистически

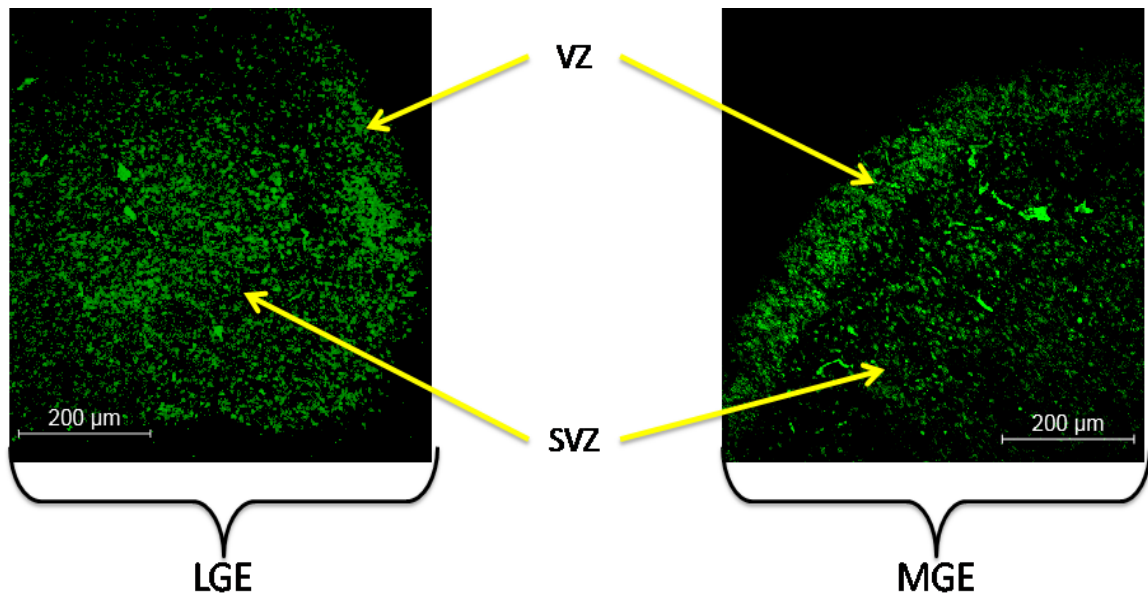
достоверна при  $t=2,30$  и  $p=0,5$ . Сравнихме и гъстотата на Sox2 положителните клетки във oSVZ в интересующите ни области. Разликата между стойностите рострално и на нивото на ганглионните еминенции беше достоверна при  $t=2,17$ ;  $p=0,02$ . Такава беше и между нивото на ЛГЕ и МГЕ и париеталния дял ( $t=2,20$ ;  $p=0,01$ ) (фиг. 4.25).



**Фиг. 4.25.** Брой Sox2 положителни клетки на  $1 \text{ mm}^2$  във VZ, iSVZ и oSVZ в човешки фетален теленцефалон през 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). А – рострално от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Проучихме експресията на Sox2 и в ЛГЕ и вМГЕ, във VZ и SVZ на двете еминенции (фиг. 4.26).



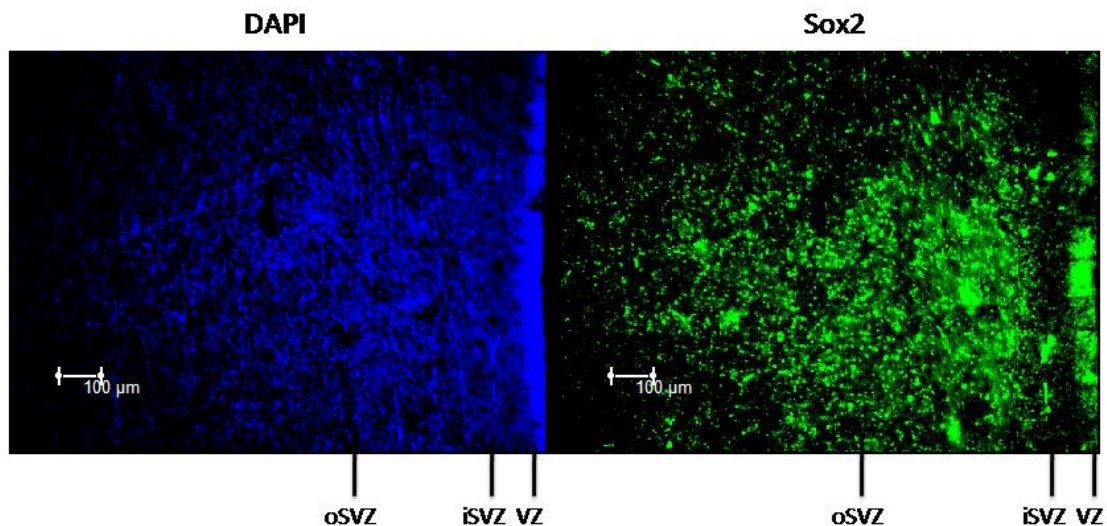


**Фиг. 4.26.** Експресия на Sox2 във VZ и SVZ на ЛГЕ и МГЕ през 20 г.с.

Във VZ на ЛГЕ гъстотата на Sox2 положителните клетки беше  $\sim 15166$  клетки на  $1 \text{ mm}^2$ , а във SVZ –  $\sim 7633$  клетки на  $1 \text{ mm}^2$ . Тази разлика беше статистически потвърдена при  $t=2,77$ ;  $p=0,05$ . В МГЕ гъстотата на Sox2 положителните клетки във VZ беше  $\sim 11333$  на  $1 \text{ mm}^2$ , а във SVZ –  $\sim 5566$  на  $1 \text{ mm}^2$ . Разликата между тези стойности не беше статистически достоверна ( $t=2,77$ ;  $p=0,18$ ).

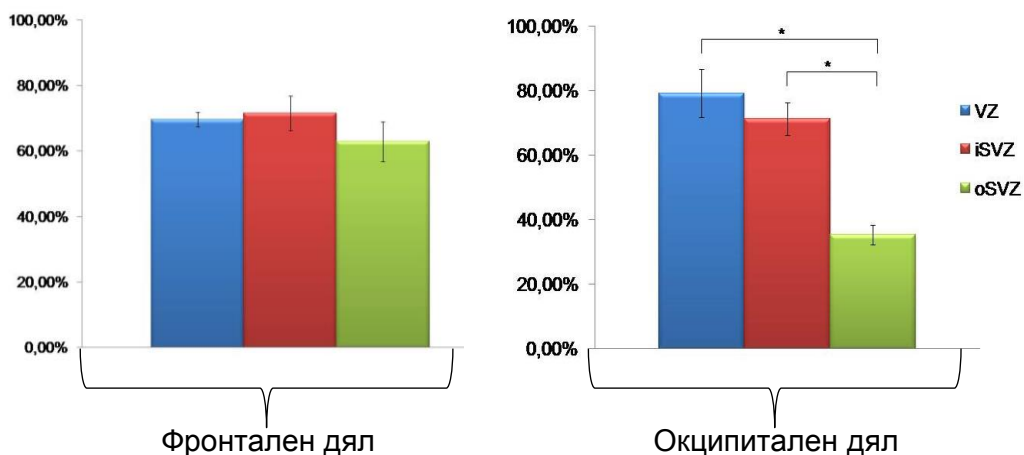
#### **4.5. Дял на Sox2експресиращи клетки от всички прогенитори**

Определихме като процент фракцията експресиращи Sox2 клетки спрямо общия брой визуализирани с DAPI клетъчни ядра (фиг. 4.27).



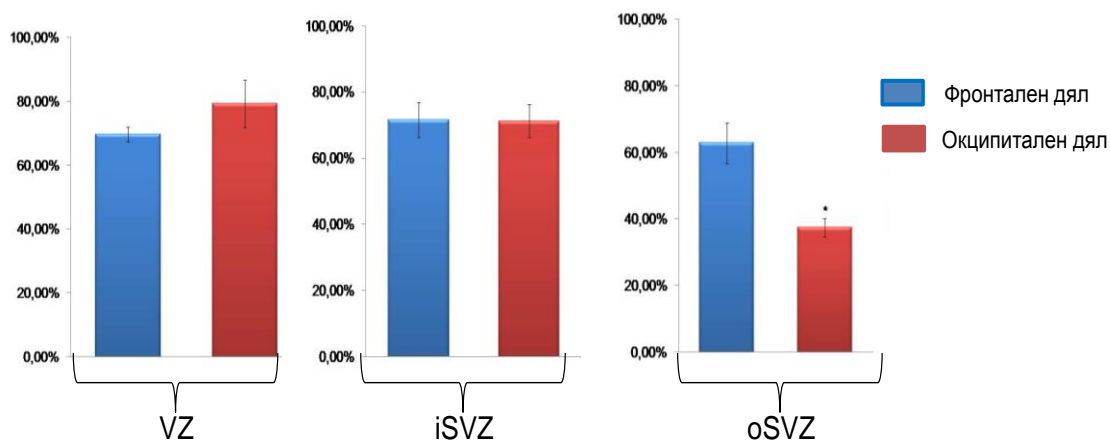
**Фиг. 4.27.** Окципитален дял на човешки фетален теленцефалон през 17 г.с. Визуализирани с DAPI клетъчни ядра (в синьо) и експресия на Sox2 (в зелено).

Във фронтален дял през 17 г.с. ~69,65% от всички клетки във VZ бяха позитивни за Sox2. Във iSVZ и oSVZ тези стойности бяха съответно ~71,56% и ~62,88%. При анализа на тези данни не установихме статистически значима разлика между трите гермнативни зони ( $t=2,44$ ;  $p=0,74$ ). Проучихме това съотношение и в окципиталния дял през 17 г.с., където установихме, че във VZ~79,24% от клетките експресират Sox2, във iSVZ този процент беше ~71,21%, а във oSVZ – ~35,39%. Получените от нас стойности показаха статистически достоверна разлика между експресията във VZ и oSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,001$ ), както и между iSVZ и oSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,001$ ). Близките по стойност процентни дялове на Sox2 позитивните клетки във VZ и iSVZ бяха потвърдени при анализа на данните с  $t=2,44$  и  $p=0,4$  (фиг. 4.28).



**Фиг. 4.28.** Процент *Sox2* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра през 17 г.с (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – венстрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвенстрикулна зона; oSVZ – външна субвенстрикулна зона.

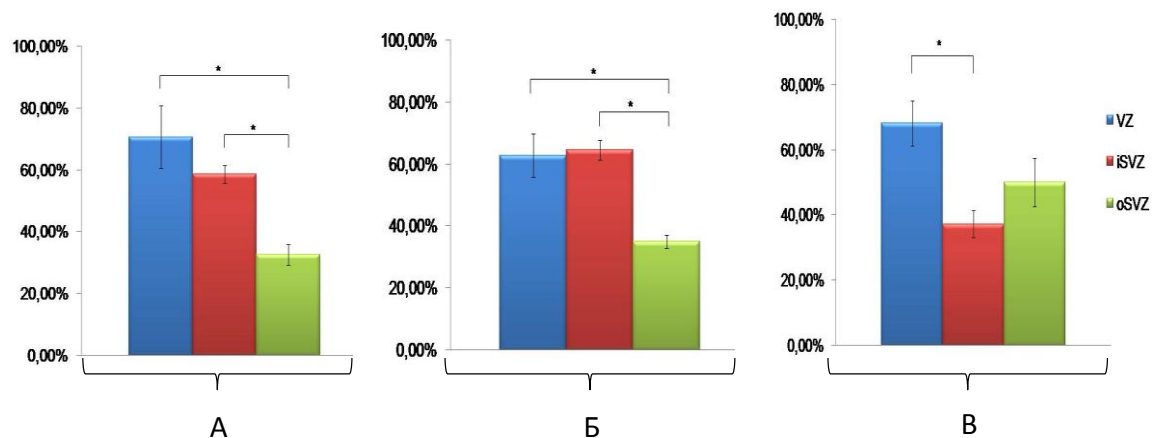
Сравнихме резултатите по зони в двата дяла. По отношение на VZ нашите данни не показаха съществена и статистически значима разлика ( $t=2,44$ ;  $p=25$ ). Сравнихме процентите *Sox2*+ клетки във iSVZ на фронтален и окципитален дял през 17 г.с. Тези стойности също бяха близки и без статистически значима разлика ( $t=2,44$ ;  $p=0,96$ ). Сравнявайки резултатите за дела клетки, експресиращи *Sox2* във oSVZ на фронтален и окципитален дял през 17 г.с., установихме статистически значима разлика при  $t=2,44$  и  $p=0,008$  (фиг. 4.29).



**Фиг. 4.29.** Процент *Sox2* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра през 17 г.с (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – венстрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвенстрикулна зона; oSVZ – външна субвенстрикулна зона.

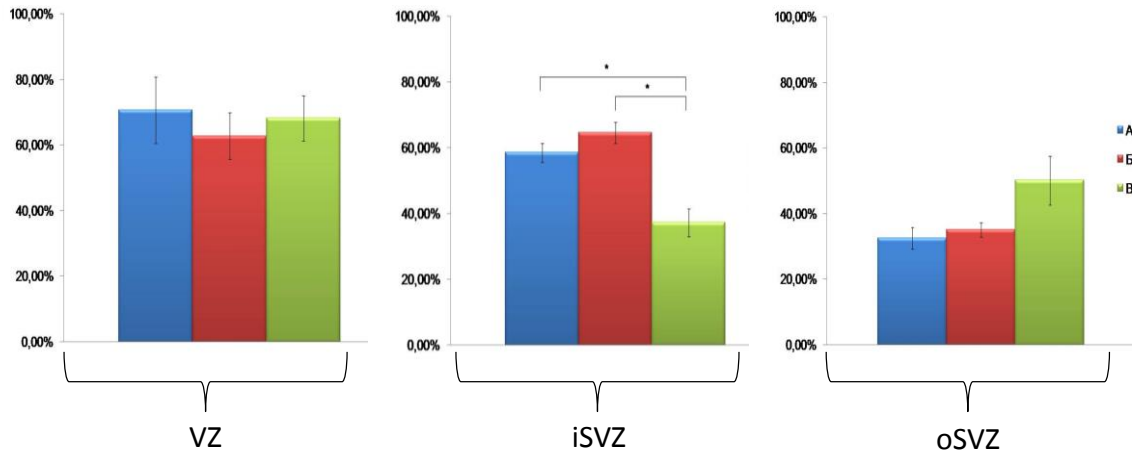
Определихме като процент фракцията, експресиращи Sox2 клетки спрямо общия брой визуализирани с DAPI клетъчни ядра през 20 г.с. рострално, на нивото и каудално от ганглионните еминенции.

Рострално от ганглионните еминенции през 20 г.с. ~70,58% от клетките във VZ експресираща Sox2 , във iSVZ този процент беше ~58,52%, а във oSVZ – ~32,53%. Разликата между VZ и oSVZ беше статистически значима ( $t=2,57$ ;  $p=0,02$ ), както и тази между iSVZ и oSVZ ( $t=2,57$ ;  $p=0,01$ ). Същевременно тази между VZ и iSVZ беше отчетена като статистически недостоверна ( $t=2,44$ ;  $p=0,29$ ). На нивото на ганглионните еминенции процентното съотношение на Sox2+ клетки спрямо маркираните с DAPI клетъчни ядра беше ~62,79% във VZ, ~64,60% във iSVZ и ~35,07% за oSVZ. В тази област също разликата в процентния дял на Sox2 експресиращите клетки във VZ и oSVZ, както и между iSVZ и oSVZ беше статистически потвърдена при съответно  $t=2,36$ ;  $p=0,01$  и  $t=2,57$ ;  $p=0,0004$ . Разликата между VZ и iSVZ беше отчетена отново като недостоверна ( $t=2,44$ ;  $p=0,85$ ). Каудално от ганглионните еминенции в париетален дял на фетален теленцефалон през 20 г.с. ~68,14% от клетките във VZ бяха положителни за Sox2 , във iSVZ този процент беше ~37,21% , а във oSVZ – ~50,11%. На това ниво не открихме статистически значима разлика между VZ и oSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,12$ ), нито между iSVZ и oSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,18$ ). Приложеният от нас анализ потвърди разликата в процента Sox2+ клетки между VZ и iSVZ ( $t=2,44$ ;  $p=0,008$ ) ( фиг. 4.30).



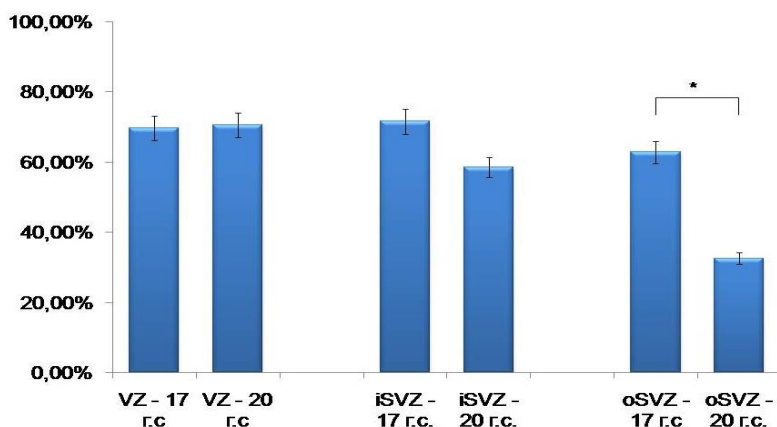
**Фиг. 4.30.** Процент *Sox2* положителни клетки спрямо всички визуализирани с *DAPI* клетъчни ядра през 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). А – рострално от ганглионните еминенции; Б – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Сравнихме така получените резултати по зони в изследваните нива и региони. За VZ отчетохме липса на статистически значима разлика в процента *Sox2*<sup>+</sup> клетки спрямо общия брой от рострално от ганглионните еминенции към каудално от тях ( $t=2,44$ ;  $p=0,84$ ). За iSVZ установихме статистически значима разлика между дела на *Sox2*<sup>+</sup> клетки рострално и каудално от ганглионните еминенции ( $t=2,44$ ;  $p=0,005$ ), както и между iSVZ на нивото на ЛГЕ и МГЕ и тази каудално от тях ( $t=2,57$ ;  $p=0,004$ ). Проследявайки експресията на *Sox2* във oSVZ от рострално към каудално отбелязахме увеличение на фракцията *Sox2*<sup>+</sup> клеткиот ~32,53% във фронтален дял рострално от ганглионните еминенции, през ~35,07% в същия дял на тяхното ниво до ~50,11% каудално от тях в париетален дял. Тази разлика обаче беше отчетена като статистически недостоверна ( $t=2,57$ ;  $p=0,11$ ) (фиг. 4.31).



**Фиг. 4.31.** Процент *Sox2* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра през 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). А – роstralно от ганглионните еминенции; В – на нивото на ганглионните еминенции; В – каудално от ганглионните еминенции. VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Сравнихме процентите *Sox2* позитивни клетки във фронтален дял през 17 г.с. и през 20 г.с. По отношение на VZ стойностите бяха много близки ( $t=2,44$ ;  $p=0,93$ ). Установихме също, че разликата между процентите *Sox2* позитивни клетки във iSVZ не е статистически значима ( $t=2,44$ ;  $p=0,07$ ). Статистически достоверна беше разликата между дела *Sox2*+ клетки във oSVZ на фронталния дял през 17 г.с. и 20 г.с. ( $t=2,57$ ;  $p=0,01$ ) (фиг. 4.32).



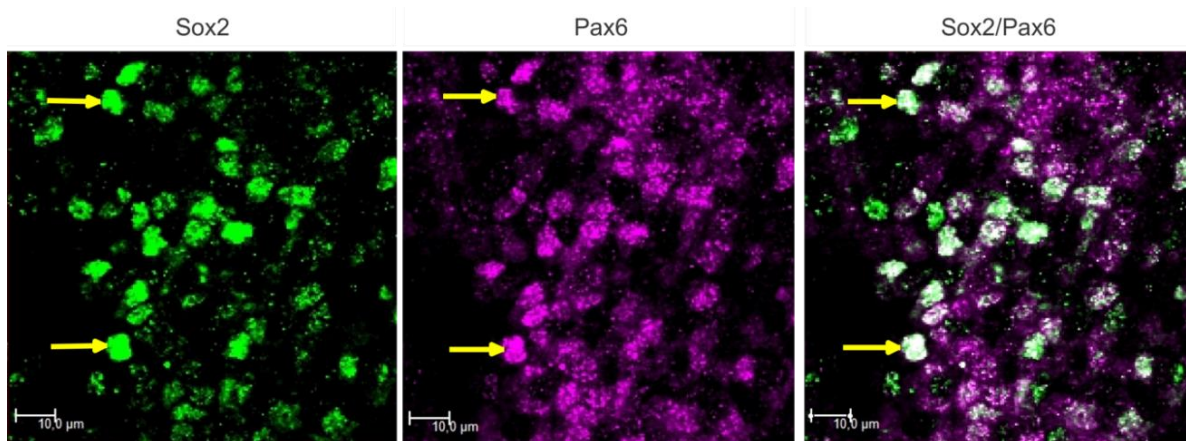
**Фиг. 4.32.** Процент *Sox2* положителни клетки спрямо всички визуализирани с DAPI клетъчни ядра във фронтален дял през 17 г.с. и през 20 г.с. (\*  $p \leq 0,05$ ). VZ – вентрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвентрикулна зона; oSVZ – външна субвентрикулна зона.

Определихме дела на Sox2+ клетки спрямо визуализираните с DAPI клетъчни ядра във VZ и SVZ на ганглионните еминенции.

Във VZ на ЛГЕ ~68,36% от клетките експресираха Sox2. Във SVZ този процент беше ~43,41%, като разликата между двете зони беше доказана чрез Т-тест като статистически достоверна ( $t=2,77$ ;  $p=0,02$ ). По отношение на МГЕ нашето проучване показва, че ~59,47% от клетките във VZ експресират Sox2 и ~29,81 % от тези във SVZ. Тази разлика беше отчетена като статистически недостоверна при  $t=2,77$  и  $p=0,13$ .

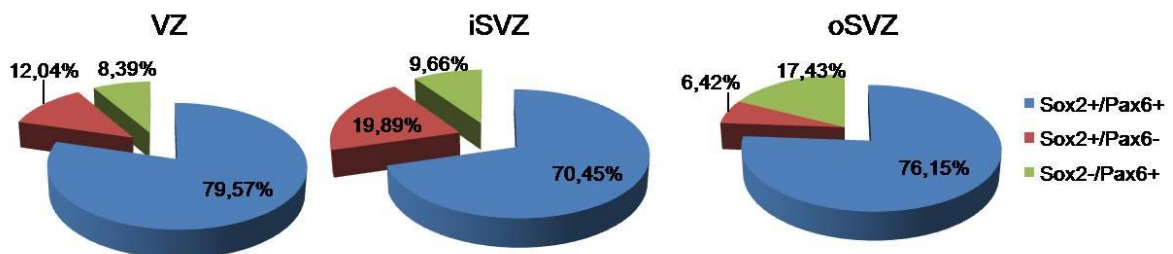
#### 4.6. Ко-локализация на Sox2 и Pax6

Във фронтален дял през 17 г.с. проучихме и ко-експресията и ко-локализацията на Sox2 и Pax6. Приехме броя на Sox2+ и Pax6+ клетки за 100% и разпределихме позитивните за тези два маркера клетки в три групи Sox2+/Pax6+ (двойно позитивни), Sox2+/Pax6- и Sox2-/Pax6+ клетки (фиг. 4.33).



**Фиг. 4.33.** Експресия на Sox2 и Pax6 във VZ на човешки фронтален дял през 17 г.с. В зелено - клетки, експресиращи Sox2; в лилаво - Pax6 позитивни клетки; стрелки - двойно-маркирани клетки (Sox2+/Pax6+ клетки).

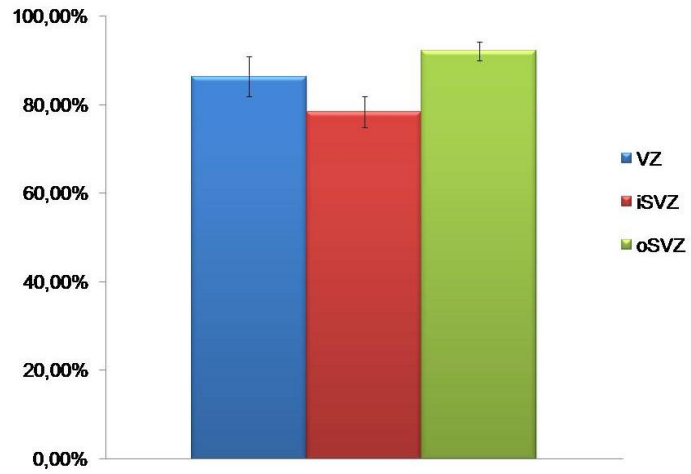
Във VZ  $79,57\% \pm 3,90\%$  от клетките бяха двойно позитивни. От останалите определихме  $12,04\% \pm 4,04\%$  като Sox2+/Pax6-, а  $8,39\% \pm 3,33\%$  определихме като Sox2-/Pax6+. Във iSVZ при разпределението на клетките според експресията на тези два транскрипционни фактора отново се оформи най-голям дял на двойно позитивните клетки ( $70,45\% \pm 0,47\%$ ), Sox2+/Pax6- бяха  $19,89\% \pm 6,94\%$ , а Sox2-/Pax6+ съответно достигнаха  $9,66\% \pm 6,47\%$ . Във oSVZ Sox2+/Pax6+ бяха  $76,15\% \pm 2,94\%$  от всички експресиращи тези маркери клетки, Sox2+/Pax6- бяха  $6,42\% \pm 3,05\%$ , а Sox2-/Pax6+ бяха  $17,43\% \pm 0,12\%$  (фиг. 4.34).



**Фиг. 4.34.** Разпределение на клетките във VZ, iSVZ и oSVZ на човешки фронтален дял през 17 г.с. според експресията на Sox2 и Pax6. VZ – венстрикулна зона; iSVZ – вътрешна субвенстрикулна зона; oSVZ – външна субвенстрикулна зона.

Определихме процента Pax6+ клетки от всички експресиращи Sox2 като съотношение на Sox2+/Pax6+ клетки към всички Sox2+. Сравнихме тези стойности в герминативните зони. И в трите зони (VZ, iSVZ, oSVZ) получихме много висок дял на тези клетки, до  $92,11\%$  във oSVZ, като разликата между тях не беше сигнификантна при  $t=2,44$  и  $p=0,38$  (фиг. 4.35).





**Фиг. 4.35.** Дял на двойно позитивните (*Sox2*+/*Pax6*+) клетки във VZ, iSVZ и oSVZ представен в проценти спрямо всички *Sox2*+ клетки. Фронтален дял, 17 г.с.

## 5. Обсъждане

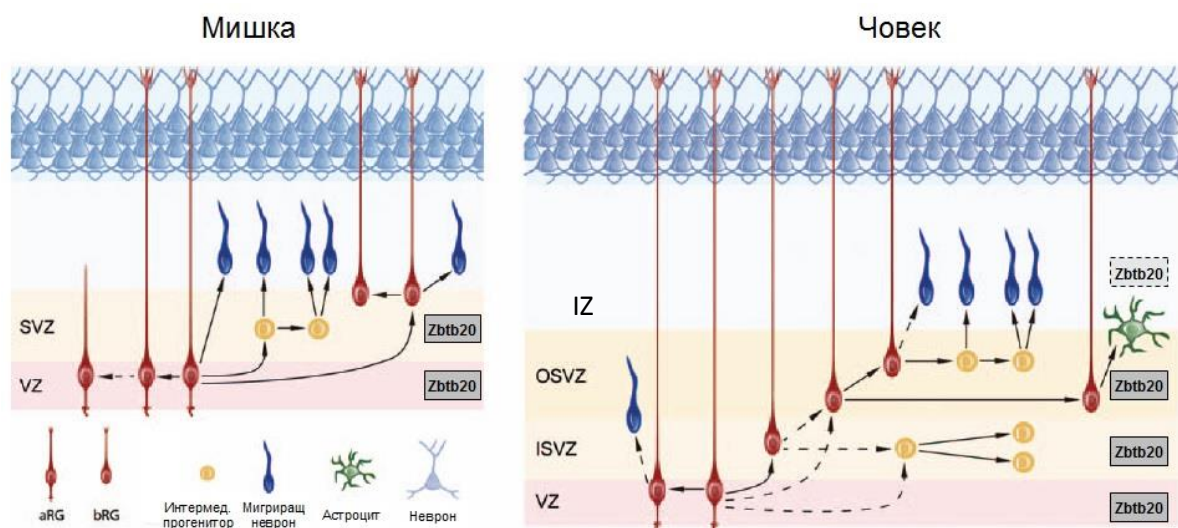
Увеличаването на повърхността и нагъването са основни характеристики на еволюционното развитие на неокортекса при бозайниците, като този процес достига най-големи мащаби при приматите, а измежду тях – при човека. Мозъчните стволони и прогениторни клетки (апикални и базални радиални стволони клетки и интермедиерни прогенитори) и клетките, които те продуцират в герминативните слоеве на дорзалния палиум (VZ, iSVZ и oSVZ) се регулират от действието на секреторни (външни за клетките) и вътрешни (като транскрипционни фактори) сигнали. Тези сигнали координират броя на митозите на прогениторите и миграцията на постмитотичните клетки към кортикалната плочка, за да се продуцират необходимия като брой и видове неврони и глия за кората. В гиренцефален мозък, какъвто е човешкият, този процес е още по-комплексен, тъй като генерираните клетки трябва да се разпръснат в тангенциална посока, за да осигурят увеличаване на повърхността на кортекса. Пациенти с дефицит на нагъването на кората страдат от интелектуално изоставане и епилепсия, което показва важността на нормалното триизмерно оформление (топология) на неокортекса за мозъчната функция и капацитет (Walsh, 1999; Guerrini et al., 2008). Отклонения в топологията на кората най-вероятно се дължат на отклонения при мозъчните стволони клетки по време на развитието (Rakic, 1995, 2009; Kriegstein et al., 2006; Dehay and Kennedy, 2007; Lui et al., 2011). Ето защо изследването на молекулните механизми, които регулират кортикогенезата при човека, е една от най-интензивно проучваните области в съвременната невронаука. Функционалните изследвания за ролята на конкретни гени в човешката кортикогенеза са затруднени от етични фактори. Те са представени от морфологични изследвания относно експресията на такива гени в човешкия дорзален палиум по време на развитието.

Настоящият дисертационен труд е именно такова проучване. Ние представяме данни за експресията и разпределението на няколко транскрипционни фактора в отделни зони на развиващия се човешки краен мозък. Допълнително се фокусираме върху тяхната локализация и коекспресия. Чрез имунохистохимична техника показваме броя и разпределението на клетки, позитивни за вече известни транскрипционни фактори (като Sox2 и Pax6), както и експресията и локализацията в дорзалния палиум на досега неизследваната в този регион молекула, транскрипционния фактор Zbtb20.

### **5.1. Транскрипционният фактор Zbtb20 се експресира в дорзален палиум на човешки фетален мозък**

За първи път е проучена експресията на Zbtb20 в развиващия се неокортекс на човек. Ние доказахме експресията на Zbtb20 във VZ, iSVZ и oSVZ на феталния палиум. Проучихме и сравнихме данните между тези три зони, като разгледахме двете части на субвентрикулната зона по отделно, като допълнително осъществихме изследвания по rostro-каудалната ос. Избрахме три нива във феталния краен мозък през 20 г.с.: роstralно от ганглионните еминенции, на тяхното ниво и каудално от тях.

Сравнявайки получените данни за експресията на Zbtb20 в трите герминативни зони през 20 г.с. отчетохме статистически достоверна разлика между VZ и oSVZ по отношение на гъстотата на Zbtb20+ клетки. Разглеждайки обаче Zbtb20+ клетки като дял от всички прогенитори, такава разлика не беше установена. Аналогичният анализ на резултатите от нашето проучване през 17 г.с. показва статистически значима разлика между VZ и oSVZ по отношение и на гъстотата и на процентния дял на Zbtb20+ клетки. Малък брой клетки, позитивни за Zbtb20, бе открит и в интермедиерната зона (IZ), където се осъществява миграция на незрелите неврони към кортикалната плочка (фиг. 5.1).



**Фиг. 5.1.** Сравнение на експресията на транскрипционния фактор *Zbtb20* в герминативните зони на мишки и човешки неокортекс по време на развитието. Докато при мишката, неокортикалната експресия на *Zbtb20* е ограничена до VZ и SVZ, при човека тя включва VZ, iSVZ и oSVZ, както отделни клетки в IZ (с модификации по Borrell and Reillo, 2012).

Данните за експресията на *Zbtb20* при мишка (Mitchelmore et al., 2002; Xie et al., 2010; Rosenthal et al., 2012) показват високи нива в хипокамп (където *Zbtb20* се експресира в постмитотични клетки) и по-ниски нива в дорзалния палиум, където той се локализира в герминативните слоеве.

Докато ролята на *Zbtb20* запазването на идентичността на хипокампа като специфичен кортикален домейн е доказана (Xie et al., 2010; Rosenthal et al., 2012), функцията на *Zbtb20* в неокортекса не е известна. Предвид известните до момента данни за значението и мястото на oSVZ в по-късните етапи на неврогенезата при човек (когато се формират супрагрануларните слоеве II-IV), можем да предположим, че експресията на *Zbtb20* през 20 г.с. в голям дял от клетките на тази зона има своята роля за формирането именно на тези слоеве на кората. В подкрепа на подобна хипотеза, данните при мишка показват, че *Zbtb20* се свързва директно с промоторите на транскрипционни фактори, които регулират баланса

между инфра- и супрагрануларните слоеве на неокортекса (Nielsen et al., 2014). Нашите данни показват, че това се случва по отношение на различни във функционално отношение корови полета (от фронтални, през париетални, до окципитални). Интересен е също и фактът, че *Zbtb20* се експресира и в постмитотични клетки на неокортикална зона (IZ), което напомня на експресията в хипокамп на мишка (фиг. 5.1). Това показва, че в човешкия неокортекс *Zbtb20* може да има допълни функции спрямо тези в мишата крайномозъчна кора.

Нашите резултати доказаха, че въпреки разликите от роstralно към каудално, в гъстотата на *Zbtb20*+ клетки (брой клетки на единица площ), процентният дял на *Zbtb20* позитивните от всички клетки (белязани с DAPI) е приблизително еднакъв и не се наблюдава изразен роstral-каудален градиент. Тези резултати контрастират с данните при мишка (Rosenthal et al., 2012), където има характерен роstral-каудален градиент на експресия с много силна изява на *Zbtb20* в каудалните зони на кората. Персистирането на сравнително висок дял *Zbtb20*+ клетки от всички прогенитори в периода между 17 и 20 г.с. подсказва за значението, което този транскрипционен фактор вероятно има за формирането и на шестслойната кора, а не само за известната до момента роля при образуване на архикортекса и хипокампалната формация.

Формирането на функционалните полета на неокортекса (ареализация) е заложено в прогениторите на палиума от градиентната експресия на комбинации от транскрипционни фактори по предно-задната ос. Разстройства в градиента на експресия на тези фактори води до дефекти в размера на полетата на Бродман и тяхната дислокация по предно-задната ос на неокортекса (Mallamaci and Stoykova, 2006; O'Leary et al., 2007). Нашите изследвания показват, че *Zbtb20* може да е един от тези фактори, което следва да се проучи по-детайлно чрез трансгенни модели при мишка.

В допълнение към палиума-предшественик на неокортикалните зони на мозъка, изследвахме експресията на *Zbtb20* и в ганглионните еминенции, които произвеждат повечето от невроните за стриатума и ГАМК-ергичните интерневрони на неокортекса (Ma et al., 2013). *Zbtb20*+ клетки бяха наблюдавани и във вентрикулната и в субвентрикулната им зона (VZ/SVZ). В двете еминенции доказахме статистически достоверна разлика в гъстотата на *Zbtb20*+ клетки във VZ и SVZ и липса на такава разлика при сравняване между ЛГЕ (предшественик на стриаталните неврони) и МГЕ (източник на прогенитори за интерневроните на неокортекса). Сходни резултати получихме и обработвайки данните за процентния дял на *Zbtb20*+ клетки в двете еминенции. Разликите между VZ и SVZ бяха статистически значими в рамките на всяка еминенция и нямаше достоверна разлика при сравняването по зони между ЛГЕ и МГЕ. Тези резултати са съвместими с литературните данни при мишка, където е налице експресия на *Zbtb20* в ганглионните еминенции (Mitchellmore et al., 2002), но проблемът с ролята на този транскрипционен фактор за генезата на прекурсори на кортикални интерневрони остава да бъде изследван. Намалването на гъстотата на *Zbtb20*+ позитивните клетки от VZ към SVZ на ганглионните еминенции показва редукция в процеса на диференциация на прогениторите на стриатални и неокортикални ГАМК-ергични неврони. Тъй като *Zbtb20* действа предимно като репресор, намалването на неговата инхибираща функция относно експресията на определени гени очевидно е насочена към гените за диференция (потискани във VZ и активирани в SVZ).

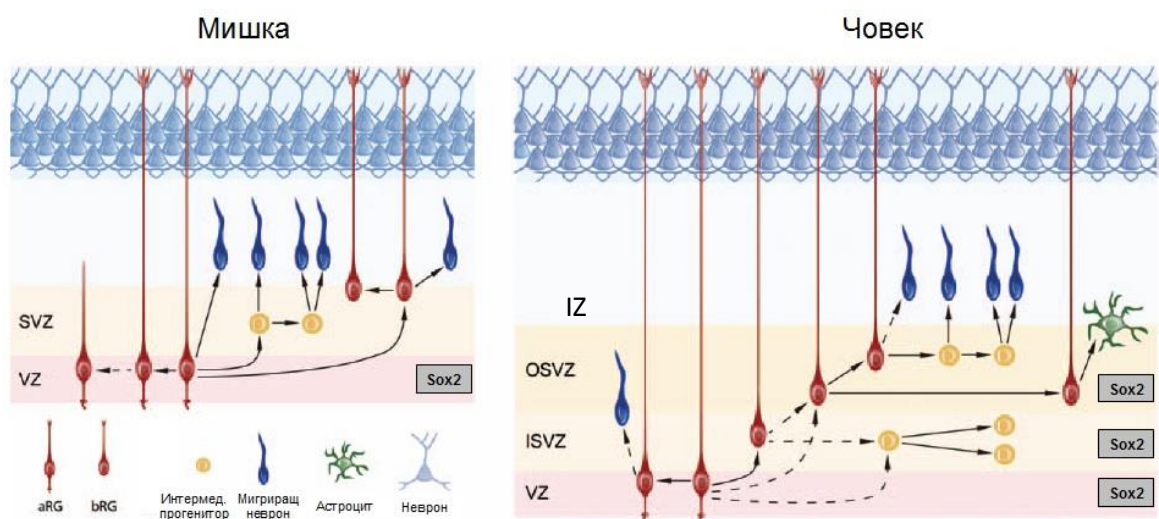
## 5.2. **Zbtb20** маркира предимно радиални глиални стволови клетки

Както беше изтъкнато, в развиващия се мозък на бозайници (вкл. мишки и хора) са открити поне три различни вида стволови/прогениторни клетки: aRG (апикална радиална глия), bRG (базална радиална глия) и IP (интермедиерни прогенитори) (Фиг. 5.1). В човешки фетален неокортекс aRG и bRG експресират транскрипционни фактори като Sox2 и Pax6, докато IP – транскрипционния фактор Tbr2/EOMES (Hansen et al., 2010). Ние установихме, че много голям дял от Zbtb20+ клетки експресираха и Sox2, което ги идентифицира като aRG (във VZ и iSVZ) и bRG (във oSVZ). Поради това, че антителата срещу Zbtb20 и Tbr2 са произведени в един и същи вид, бе невъзможно да преценим дали субпопулация от IP прогенитори също експресира Zbtb20. Наличието, обаче, на Zbtb20+ клетки в базалната oSVZ и отчасти в IZ (фиг. 5.1) дава основание да се предположи, че това е така. Необходими са допълнителни изследвания в тази насока. Няма съмнение, обаче, че основната популация от прогенитори, които експресират Zbtb20, са радиалните стволови клетки. Тъй като Zbtb20 регулира пролиферацията на тези клетки в медиалния палиум при мишка (предшественик на хипокампа) (Xie et al., 2010), ние допускаме, че Zbtb20 е от значение за поддържането на тази стволовоклетъчна популация, регулирайки процеси като пролиферация и диференциация.

В потвърждение на подобна хипотеза ние открихме съществуването на апико-базален градиент в гъстотата на клетките (предимно радиални стволови клетки), експресиращи Zbtb20: по-голяма гъстота апикално във VZ, по-малка гъстота базално във oSVZ. Това вероятно съответства на по-големите нива на диференциация на стволовите клетки базално и наличието на по-недиференцирани прогенитори апикално.

### 5.3. Експресията на транскрипционния фактор Sox2 спрямо тази на Zbtb20

Изследвахме експресията на Sox2 през 17 г.с. и 20 г.с. от пренаталното развитие. Установихме статистическо значимо намаление в гъстота на Sox2+ клетки във oSVZ спрямо VZ/iSVZ и през двата периода. Налице е и нарастване от роstralна към каудална посока. Това показва наличие на два градиента: роstro-каудален и апико-базален градиент в гъстотата на клетките, експресиращи Sox2, по подобие на Zbtb20, но без експресия на Sox2 в IZ (фиг. 5.2).



**Фиг. 5.2.** Сравнение на експресията на транскрипционния фактор Sox2 в герминативните зони на мишки и човешки неокортекс по време на развитието. При мишката, неокортикалната експресия на Sox2 е ограничена до VZ, при човека тя включва VZ, iSVZ и oSVZ, (с модификации по Borrell and Reillo, 2012).

Това съответства на по-големите нива на диференциация на стволовите клетки базално и наличието на по-недиференцирани прогенитори апикално. Отсъствието на експресия на Sox2 в IZ показва, че в сравнение със Zbtb20, Sox2 се експресира на по-ранен стадий на развитие: стадий на



радиалните стволови клетки, но не и на интермедиерни прогенитори или постмитотични невробласти.

Анализирахме експресията на Sox2 в рамките на всяка зона от роstralно към каудално. На нивото на VZ не отчетохме съществена разлика в дела на Sox2+ клетки от всички прогенитори. За iSVZ нашите резултати показаха статистически значимо намаление на дела на Sox2+ клетки от роstralно към каудално. По отношение на oSVZ анализът на данните доказва статистически достоверно нарастване в броя клетки на единица площ от роstralно към каудално.

Заслужава да се отбележи, че през 20 г.с. се наблюдава разлика в градиента на гъстота на Sox2+ клетки във iSVZ спрямо oSVZ. Докато във iSVZ гъстотата расте от каудално към роstralно, във oSVZ се наблюдава обратната тенденция. Тези резултати са много интересни, защото показват, че различните герминативни зони може да изпълняват различна функция и кодират генезата на различни прогенитори или постмитотични клетки.

Нашите данни за експресията на Zbtb20 в ганглионните еминенции и ко-експресията на Sox2 и Zbtb20 в ЛГЕ и МГЕ са съвместими с данните за гъстотата на Sox2+ клетки в тези две зони, които произвеждат прогенитори на кортикалните ГАМК-ергични интерневрони. По-голямата гъстота на Sox2+ клетки във VZ на ганглионните еминенции в сравнение на SVZ на същите показва наличие на Sox2 в стволови клетки на ЛГЕ и МГЕ, като както Sox2, така и Zbtb20 може би участват тяхната регулация. Функционални трансгенни миши модели ще покажат дали тази хипотеза е вярна.

Многообразието при образуване на неврони в мозъчната кора при човека се осъществява с участието на различни транскрипционни фактори в края на пренаталното развитие и първите постнатални седмици (Inta et al., 2008; Hanna et al., 2010), като субвентрикулната зона на фронталния дял се посочва за място на генериране на такива неврони след 20-та г.с.

Експресията на определени транскрипционни фактори и глутамат-позитивни клетки в субвентрикулната зона на феталния теленцефалон през 20-24 г.с. определя позитивните клетки като пирамидни, проекционни неврони, които още не са мигрирали към кортикалната плоча. Счита се, че това са клетки, предназначени за горните слоеве на кората (Englund et al., 2005). Известно е, че Sox2 е ключов фактор в контрола на количеството на стволовите/прогенитерни клетки в развиващия се мозък (Lee et al., 2014; Shimozaki, 2014). Наблюдаваната от нас динамика в експресията на Sox2 в отделните герминативни зони на три различни нива, както и в rostro-каудална посока определено показва участието на този транскрипционен фактор в герминативните процеси през 20г.с. Той се експресира в радиалните прогенитори, които генерират изключително глутаматергични неврони в герминативните зони на дорзалния палиум. Инактивация на Sox2 в тези клетки по време на развитието при мишка води до значителна редукция на броя на глутаматергичните неврони и дебелината на кортекса като цяло (Cavallaro et al., 2008, Miyagi et al., 2008). При дефицит на Sox2 се развива невродегенерация и нарушена неврогенеза при възрастни мишки (Ferri et al., 2004). Ето защо ние смятаме, че детайлното изследване на транскрипционния фактор Sox2 в човешкия фетален теленцефалон е от важно значение за разкриване генетичната основа на някои вродени неврологични заболявания на мозъка.

#### **5.4. Субпопулации от прогенитори в палиумните герминативни зони се характеризират със специфична експресия на Sox2 и Pax6**

В допълнение към мнозинството радиални стволови клетки, които експресират както Sox2, така и Pax6 (Sox2+/Pax6+), в развиващия се неокортекс са налични и субпопулации от клетки, които са Sox2+/Pax6- или Sox2-/Pax6+, като по този начин се различават от болшинството радиални стволови клетки. Такива клетки се установиха както във VZ, така

и във iSVZ и oSVZ. Във oSVZ това биха могли да са клетки, които се диференцират към IP прогенитори, но във iSVZ и VZ това е по-малко вероятно. Допълнителни проучвания са необходими, за да се докаже точната идентичност на тези клетки.

## 6. Изводи

1. Транскрипционният фактор Zbtb20 се експресира във VZ, iSVZ и oSVZ на човешки фетален мозък.
2. Болшинство Zbtb20+ клетки са радиални глиални стволови клетки (апикални и базални), докато малка част са интермедиерни прогенитори във oSVZ.
3. Съществува ростро-каудален градиент в гъстотата на радиалните стволови клетки, експресиращи Sox2/Zbtb20, вероятно кореспондиращ на по-ранната матурация на каудалния спрямо ростралния кортекс.
4. Съществува апико-базален градиент в гъстотата на радиалните стволови клетки, експресиращи Sox2/Zbtb20 (повече апикално във VZ, по-малко базално в oSVZ), вероятно кореспондиращ на по-големите нива на диференциация на стволовите клетки базално.
5. Палиумните герминативни зони се съдържат малък процент клетки, които са Sox2+/Pax6- и Sox2-/Pax6+, като по този начин се различават от болшинството Sox2+/Pax6+ прогенитори.

## **7. Приноси на дисертационния труд**

1. За първи път се описва експресия на транскрипционния фактор *Zbtb20* в човешки фетален дорзален палиум.
2. Оригинални са данните относно фенотипа на *Zbtb20*-експресиращите клетки.
3. Оригинални са данните относно наличието на ростро-каудален градиент в гъстотата на радиалните стволови клетки, експресиращи транскрипционните фактори *Sox2* и *Zbtb20*.
4. За първи път се описва апико-базален градиент в гъстотата на радиалните стволови клетки, експресиращи *Sox2/Zbtb20*.
5. За първи път в човешки дорзален палиум се описва наличие на малък процент клетки, които са *Sox2+/Pax6-* и *Sox2-/Pax6+*, като по този начин се различават от болшинството *Sox2+/Pax6+* прогенитори.

## **8. Публикации във връзка с дисертационния труд**

1. **Ангелова М**, Горанова В, Маринова Д, Павлов С, Михалева В, Ямашима Т, Тончев А (2014) Експресия на транскрипционен фактор Sox2 в популации от кортикални прогенитори в човешки фетален теленцефалон. Варненски медицински форум 3(2):5-9.
2. **Angelova M**, Minkov R, Goranova V, Pavlov S, Michaleva V, Tonchev A (2015) Expression of transcription factor Coup-TF1 (NR2F1) in developing occipital cortex in humans. Scripta Scientifica Medica 47(1):53-56.
3. **Ангелова М**, Павлов С, Михалева В, Горанова В, Тончев А (2015) Рostro-каудален градиент в експресията на транскрипционен фактор SOX2 във фетален мозък при човек. Варненски медицински форум 4(1):94-98.

## **9. Участия в научни форуми**

1. **Angelova M**, Pavlov SP, Mihaleva V, Goranova V, Tonchev A. Rostro-caudal Gradient in the Expression of the Transcriptional Factor Sox2 in Fetal Human Brain. XXII Национален конгрес на Българското анатомично дружество, 09.06-07.06. 2015 г., гр. Пловдив.

## **Благодарности**

Благодаря на проф. д-р Антон Тончев за предоставените ми възможности, за доверието, търпението и времето, което отдели за това проучване.

Сърдечно благодаря на доц. д-р Ваня Горанова за ентузиазма и енергията, които вложи в съвместната ни работа.

На моите колеги д-р Стоян Павлов, д-р Десислава Маринова и д-р Веселина Михалева благодаря за помощта и приятелството.

Благодаря на сестра ми, Елена Христова, за позитивната енергия и оптимизма, с които ме подкрепяше.

На моите родители, д-р Валдемар Христов и д-р Снежана Христова, благодаря за обичта и безусловната подкрепа.

Благодаря на съпруга ми, к.д.п. Борис Ангелов, за вярата в мен, за свалените звезди и за всичко, което е в моя живот.

.