



## Информация за изпълнение на етап на проект

<b>Наименование на конкурса:</b>
Конкурс за финансиране на научни изследвания – 2017 г.
<b>Основна научна област:</b>
Медицински науки
<b>№ на договор:</b>
ДН 13/10 от 19.12.2017 г.
<b>Начална и крайна дата на проекта:</b>
19.12.2017 г. – 19.12. 2020 г.
<b>Заглавие на проекта:</b>
Постисхемична невропротекция: роля на грелина и транскрипционния фактор Pax6
<b>Базова организация:</b>
Медицински Университет – Варна
<b>Партньорски организации:</b>
Няма
<b>Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):</b>
Доц. д-р Ирина Иванова Стоянова-ван дер Лаан, д.м.
<b>Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:</b>
60 000.00 лв.
<b>Интернет страница на проекта (ако има такава):</b>
<b>Научни публикации по проекта:</b>
1 Dazortsava MY, Pyko IV, Boneva NB, Tonchev AB, Zhu H, et al. (2018) Implication of GPR40 Signaling in the Subventricular Zone Neurogenesis after Ischemia <i>via</i> Cross-Talk between Neural Progenitors and Microglia. J Alzheimers Dis Parkinsonism 8: 454. doi: <a href="https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000454">10.4172/2161-0460.1000454</a> <b>IF 3</b>
2 Monika Chongtham, Haifang Wang, Christina Thaller, Nai-Hua Hsiao, Ivan Vachkov, <b>Stoyan Pavlov</b> , Lorenz Williamson, Tetsumori Yamashima, Anastassia Stoykova, Jun Yan, Gregor Eichele and <b>Anton B. Tonchev (2019)</b> Atlas of transcripts characterizing the subventricular zone niche of the ischemic primate brain. <b>Submitted to eLife, IF 7.7</b>
<b>Участия в научни прояви:</b>
<b>1 Morfov, D. Bukovinov, V. Mihailova, S. Pavlov, A. Tonchev, I. Stoyanova.</b> Effect of stroke on the quantity of de novo generated cells in the brain of mice with <b>inactivated</b> transcription factor Pax6 S. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10 2018, Sofia, Bulgaria <b>(talk)</b>
<b>2 Mihailova V, D. Bukovinov, S. Morfov, S. Pavlov, A. Tonchev, I. Stoyanova.</b> Effect of stroke on the expression of astrocyte marker GFAP in the brain of mice with <b>inactivation</b> of the transcription factor Pax6. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10 2018, Sofia, Bulgaria <b>(talk)</b>



<p>3 Zhelezov M, <b>S. Pavlov</b>, A. Maucher, E. Kovachev, Tsv. Kachovski, <b>A. Tonchev</b>. Microglia show heterogeneous subpopulations during human forebrain development. VII National Conference with international participation "Morphological Days", June 8 – 10 2018, Sofia, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>4 Stoyanov D, <b>Pavlov S</b>, Stoykova A, Ivanov M, <b>Tonchev AB</b>. Time of birth of murine neocortical interneurons in absence of transcription factor Zbtb20. VII National Conference with international participation "Morphological Days", June 8 – 10 2018, Sofia, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>5 Harizanova E, <b>S. Pavlov</b>, M. Manthou, D. Angelov. Synaptophysin quantification via advanced morphological filtering of widefield epifluorescence images. ICMS for students and young doctors, May 9-12 2019, Sofia, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>6 <b>Tonchev, A.B.</b>, H. Wang, C. Thaller, S. Pavlov, T. Yamashima, A. Stoykova, J. Yan, G. Eichele. Transcriptional landscape of adult monkey subventricular zone after ischemia. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, May 31-June 02, 2019, Starozagorski Mineralni Bani, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>7 <b>Morfov, S.R., V.D. Michailova</b>, T. Döppner, D.D. Bukovinov, <b>I. Stoyanova, A.B. Tonchev</b>. Effect of stroke on the de novo generated cells in the mice brain with <b>activated</b> transcription factor Pax6. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, May 31-June 02, 2019, Starozagorski Mineralni Bani, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>8 <b>Mihaylova V, I. Stoyanova</b>, T. Döppner, <b>A.B. Tonchev</b>. Effect of stroke on the expression of astrocyte marker GFAP in the brain of mice with <b>activated</b> transcription factor Pax6. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, May 31-June 02, 2019, Starozagorski Mineralni Bani, Bulgaria <b>(talk)</b></p>
<p>9 Marinova, D., M. Angelova, V. Zhekova, <b>S. Pavlov</b>, V. Goranova, <b>A.B. Tonchev</b>. Cellular proliferation in the region of the central canal in primates. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, May 31-June 02, 2019, Starozagorski Mineralni Bani, Bulgaria <b>(poster)</b></p>
<p>10* Stoyanova I (2019) <i>In vitro</i> model of ischemic stroke. Potential intracellular factors preventing the secondary brain damage and ameliorating postischemic recovery. Invited lecture, University of Twente, the Netherlands</p>



**Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):**

Очакваните резултати от изследванията по проекта са в две насоки: първо, постигане на нови знания относно природата на инсулта и очертаване на перспективи за тяхното практическо приложение за решаване на един от най-значимите социални проблеми – изключително високата смъртност сред населението, дължаща се на това остро невродегенеративно заболяване; и второ – повишаване капацитета на нашата организация и квалификацията на членовете на колектива.

За изясняване механизмите на мозъчното увреждане при инсулт предвиждаме провеждането на проучвания върху два експериментални модела: 1) *in vitro* модел, при който дисоциирани кортикални неврони се подлагат на хипоксия в продължение на 6 ч. (приблизително времето от появата на инсулта до момента на приемането на пациента за болнично лечение); и 2) *in vivo* модел с опитни животни – мишки, на които едностранно е клампирана в продължение на 1 ч. една от артериите, кръвоснабдяваща мозъка, след което се възстановява кръвоснабдяването и се изследват измененията, настъпили през следващите 3-4 седмици. Очакванията ни са да установим какви изменения настъпват в невроните и глиалните клетки, както и в синаптичните контакти, под влияние на хипоксията, която е от изключителна важност за възстановяване на мозъчната активност (при краткотрайна хипоксия) и/или за предразване от вторично увреждане на тъканта около центъра на инсулта, което би дало шанс на пациентите с инсулт да постигнат едно по-пълно възстановяване.

Тъй като все още не съществува специфична терапия за инсулта, а не всички пациенти получили инсулт умират, предполагаме, че мозъкът има вътрешни механизми, които допринасят за преодоляването на увреждането, предизвикано от хипоксията. Ето защо нашите изследвания са планирани в едно ново направление – да се изясни ролята на някои вътреклетъчни фактори, като транскрипционен фактор Рахб и невротрансмитерът грелин за само/определяне на клетъчната съдба след исхемично мозъчно увреждане. Така резултатите от нашите изследвания върху трансгенни мишки и третирането на кортикарните култури с грелин биха ни насочили към нов потенциален подход за предотвратяване и третиране на исхемичното мозъчно увреждане.

По отношение повешаване капацитета на базисната ни организация предвиждаме създаването на лаборатория за култивиране на мозъчни клетки, което ще разшири чувствително спектъра от експерименти и същевременно ще реши един морално-етичен проблем – редуциране брой на използваните опитни животни за различни фундаментални изследвания.

Проектът би бил отлична възможност за участниците в екипа да получат допълнителна квалификация, а младите членове на колектива да бъдат обучени в редица изследователски методи - имунохистохимия, анализ на образи, статистическа обработка на данни и клетъчно култивиране. Очакваме младите изследователи също така да изготвят и защитят успешно дисертационни трудове за придобиване на образователна и научна степен “Доктор” .



## Членове на научния колектив

<i>Организации/участници<sup>1</sup></i>	<i>Бележка<sup>2</sup></i>
<i>Базова организация:</i>	
Медицински Университет – Варна	
<i>Ръководител на научния колектив</i>	
Доц. д-р Ирина Иванова Стоянова-ван дер Лаан, д.м	ПД
<i>Участници:</i>	
Проф. Д-р Антон Божидаков Тончев, д.м.н.	ПД
Д-р Стоян Павлов Павлов, д.м.	ПД
Д-р Радослав Христов Спасов <sup>1</sup> , асистент - не през целия период	ДО
Д-р Станислав Радостинов Морфов, асистент	ДО
Д-р Виктория Детелинова Михайлова	ДО
<i>Партньорска организация:</i>	
-	
<i>Участници:</i>	

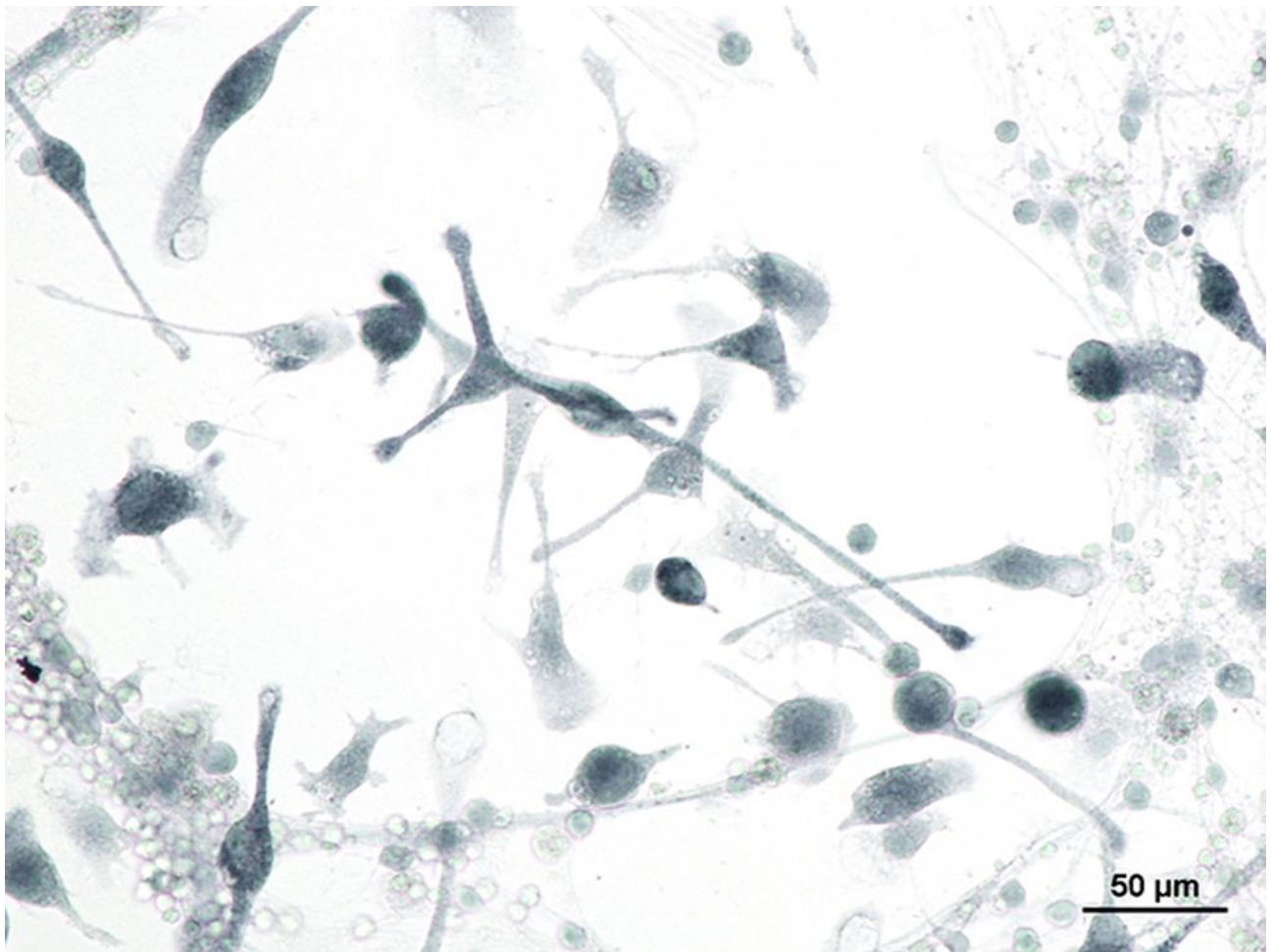
<sup>1</sup> Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

<sup>2</sup> Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



**Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)**

Изследвания *in vitro* върху култури от кортикални неврони - Проведени бяха експерименти върху култури на възраст 1 и 4 дни *in vitro* (DIV), 1-, 2- и 3-седм. (WIV). В края на 3WIV се счита, че културите са достигнали зрелост и синаптогенезата е завършила. По тази причина първо изследвахме количествено експресията на грелиновия рецептор (GHSR1) с оглед на бъдещото им третиране с грелин, и броя на синапсите за всеки от изброените възрастови периоди. Зрелите култури бяха разделени на 3 групи: а) контролна; б) подложени на хипоксия за 6 ч.; и в) след 6 ч. хипоксия, възстановяване на O<sub>2</sub> подаване за 3 ч.. Последва фиксиране и изследване на културите за експресия на синаптичния маркер synaptophysin (SPh) и транскрипционен фактор Pax6 (маркер за пролифериращи невроепителни/прогениторни клетки)(Фиг.1). *In vitro* установихме, че хипоксията намалява броя на синапсите на  $\mu\text{m}^2$ , невроните, експресиращи GHSR1 и процента на Pax6-експресиращите клетки от 63.4 на 42.7%, след което 3 ч. нормоксия довежда до увеличавани броя на синапсите и рецептор-експресиращите неврони, както и усилване на пролиферативните процеси и повишаване дела на Pax6 позитивните клетки до 68.4%. Дали глиалните или невронални прогенитори пролиферират, предстои да установим през втория етап на проекта. Резултати от изследвания *in vivo* - При изследване ефекта на хипоксията върху мозъка на мишка използвахме диви и селективни за кортекса (conditional) Pax6 нокаут (Pax6cKO) и Pax6cOE (overexpression, or gain of function) животни, нетретирани или подложени на хипоксия чрез клампиране за 1 ч. на средната церебрална артерия. След оперативната намеса в продължение на 10 дни (18-ти до 28-ми ден) животните бяха инжектирани с BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine), който измества тимидина в молекулата на ДНК през S-фаза и маркира пролифериращите клетки. Направеното двойно имуноцитохимично оцветяване за доказване на BrdU и астроцитния маркер GFAP показва от една страна увеличаване броя на астроцитите около зоната на инсульта, в сравнение с противоположната хемисфера, а от друга демонстрира астроцитна пролиферация при усилен експресия на Pax6 и намаляване на пролиферацията при понижена експресия на Pax6. Това недвусмислено доказва ролята на Pax6 при активирането на астроцитите, а от там и на защитните механизми в мозъка. Както е известно, астроцитите играят важна поддържаща роля по отношение на невроните и са в състояние да доставят енергия за тяхното функциониране чрез пируват при липса на глюкоза. При инсулт имаме намален приток на O<sub>2</sub> и глюкоза към инфарктната зона и вероятно активирането на астроцитите чрез Pax6 довежда до подаване към невроните на този енергиен субстрат. Независимо, че тези резултати подсказват наличие на възможности за осъществяване на невропротекция при инсулт, предвиждаме да разширим обхвата на изследваните маркери и транскрипционни фактори, като напр. Zbtb20, който регулира прехода между невrogenеза и глиогенеза, и така да задълбочим познанията си по отношение на тези слажни механизми, което би ни предоставило възможност за известен контрол над тях. В рамките на проекта бяха съфинансирани изследвания на главната невrogenна ниша (субependимна зона на латералното мозъчно стомахче) на примати (маймуни от вида макаки).



Фиг.1. Култивирани кортикални неврони на възраст 3 WIV, които са били подложени на 6 ч. хипоксия. Имунохистохимичното оцветяване за откриване на Рах6 показва отлагане на сиво-черни гранули от реакционен продукт в невроепителни (прогениторни) клетки, каквито почти не наблюдаваме при неврони на тази възраст, култивирани в среда с нормално количество  $O_2$ .