



UNIWERSYTET RZESZOWSKI
KOLEGIUM NAUK MEDYCZNYCH

Praca doktorska

mgr Maciej Przemysław Golan

**Analiza histologiczna i bioinformatyczna
kluczowych markerów oligodendrocytów w
wybranych obszarach mózgu człowieka i psa**

Promotor:

Dr hab. n. wet. Agata Wawrzyniak, prof. UR
– Uniwersytet Rzeszowski

Promotor pomocniczy:

Dr hab. inż. Sebastian Piłsyk
– Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Rzeszów 2023

**Dziękuję obojgu promotorom, za cierpliwość, natchnienie, nieocenioną pomoc i
inspirację.**

**Chciałem również podziękować wszystkim Pracownikom Zakładu Neuropatologii
IPiN oraz Zakładu Medycyny Sądowej WUM za lata wspólnej pracy, wsparcie i
motywację do wykonania tej pracy oraz za dostęp do materiału, bez którego nie
udało by się wykonać części badań. Przede wszystkim jednak za niezwykle
przygodę, jaką było tworzenie wirtualnej bazy Banku Mózgów.**

**Dziękuję również wszystkim bliskim za wsparcie, motywację i wiarę w pomyślne
zakończenie tej pracy.**

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów używanych w pracy	A
Streszczenie	C
I. Wstęp	1
I.1 Historia badań nad oligodendrocytami	1
I.2 Funkcja oligodendrocytów	2
I.3 Budowa mieliny i jej kluczowe białka	3
I.4 Dysfunkcje mieliny	4
I.5 Najważniejsze białka oligodendrocytów – mielinowe białko zasadowe mieliny	5
I.6 Najważniejsze białka oligodendrocytów – mielinowa glikoproteina oligodendrocytów	6
I.7 Białko odpowiedzialne za gospodarkę żelazową w oligodendrocytach ferrytyna	6
I.8 Badania nad ewolucją układu nerwowego	7
I.9 Budowa mózgowia	8
I.9 Badania nad ewolucją i chorobami mózgu – wykorzystywane modele	10
II. Cel pracy	11
III. Materiały i metody	13
III.1 Analiza histologiczna	13
III.1.1 Materiał biologiczny wykorzystany w badaniach	13
III.2 Metody	14
III.2.1 Impregnacja tkanki glejowej solami srebra	14
III.2.2 Histochemiczne wykrywanie obecności żelaza w oligodendrocytach według LeVine	15
III.2.3 Barwienie oligodendrocytów metodą Nissla	15
III.2.4 Morfologiczne kryteria pozwalające na odróżnienie komórek glejowych i neuronów	16
III.2.5 Barwienie metodą Klüvera-Barrery	16
III.2.6 Barwienie immunohistochemiczne na obecność MBP –(materiał ludzki)	16
III.2.7 Barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka MBP (materiał psi)	17
III.2.8 Określenie gęstości oligodendrocytów w wybranych obszarach OUN	18
III.2.9 Obróbka danych i analiza statystyczna	18
III.3 Analiza bioinformatyczna	19
III.3.1 Analizy wykonane dla białek ferrytyn	19
III.3.1.1 Kryteria doboru danych do analizy i użyte oprogramowanie	20

III.3.2	Analizy dla białek MBP	20
III.3.3	Analizy dla białek MOG	21
III.3.4	Analiza promotora genu MOG	22
IV.	Wyniki	23
IV.1	Obserwacje lokalizacji OLG w obszarach słabo i mocno zmielinizowanych mózgowia u człowieka i psa na poziomie mikroskopu świetlnego	23
IV.1.1	Barwienie metodą Klüvera-Barrery	23
IV.1.2	Barwienie metodą Nissla	23
IV.1.3	Impregnacja solami srebra	25
IV.1.4	Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza w oligodendrocytach	27
IV.1.5	Barwienie na obecność białka MBP	29
IV.1.6	Określenie liczby oligodendrocytów w wybranych obszarach OUN	31
IV.2	Analizy filogenetyczne	31
IV.2.1	Analiza filogenetyczna ferrytyn	31
IV.2.2	Analiza filogenetyczna białka zasadowego mieliny	35
IV.2.3	Analiza filogenetyczna białka MOG	37
V.	Dyskusja	47
VI	Wnioski	57
VII	Bibliografia	58

Wykaz skrótów używanych w pracy

AD – choroba Alzheimerera

ALS – stwardnienie zanikowe boczne

BSA – albumina bydlęca

BTN – butyrofiliny

CA – róg Amona

CC – ciało modzelowate

CEM – mikroskopia krioelektronowa

CNP1 – cykliczna fosfodiestraza

DAB – diaminobenzzydina

EM – mikroskopia elektronowa

EST – Expressed sequence tags - baza eksprymowanych sekwencji

FT – ferrytyna

FTA – pierwotna forma ferrytyny

FTH – łańcuch ciężki ferrytyny

FT-HA – ferrytyna – łańcuch ciężki A

FTL – łańcuch lekki ferrytyny

FTM – łańcuch pośredni ferrytyny

FToid – ferrytoid

GD – zakręt zębaty

Hip – hipokamp

HRP – peroksydaza chrzanowa

IF – immunofluorescencja

IHC – immunohistochemia

LF – płat czolowy

MBP – zasadowe białko mieliny

MDL – główna linia gęsta

MOG – mielinowa glikoproteina oligodendrocytów

NA – apertura numeryczna

OLG – oligodendrocyty

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PD – choroba Parkinsona

PLP – proteolipidowe białko mieliny

PNS – obwodowy układ nerwowy

SLM – warstwa jamisto-drobinowa

SM – stwardnienie rozsiane

SO – warstwa początkowa

SP – warstwa piramidalna

SR – warstwa promienista

TF – czynnik transkrypcyjny

TFR – receptor typu TF

Streszczenie

Oligodendrocyty to najliczniej występujące komórki glejowe układu nerwowego. Główną ich funkcją jest ochrona neuronów, wsparcie metaboliczne komórek nerwowych, gromadzenie żelaza niezbędnego do procesów biochemicznych, zachodzących we wszystkich komórkach układu nerwowego i zapewnienie im osłony, niezbędnej dla prawidłowego przewodzenia impulsów w neuronach. W niniejszej pracy dokonano analizy morfometrycznej i morfologicznej oligodendrocytów w trzech obszarach mózgu człowieka i psa: hipokampie (*hippocampus*), płacie czołowym (*lobus frontalis*) i ciele modzelowatym (*corpus callosum*). W oparciu o standardowe i specjalne badania histologiczne dokonano analizy morfologicznej i morfometrycznej oligodendrocytów w wybranych obszarach mózgowia człowieka i psa.

Uzyskane wyniki wskazują na brak istotnych różnic morfologicznych pomiędzy obydwoma gatunkami, potwierdzając, że sam proces mielinizacji jest zjawiskiem stabilnym ewolucyjnie w większości grup zwierząt kręgowych. Wyniki tej części pracy potwierdzają również, że pies może być naturalnym modelem chorób, związanych z uszkodzeniami oligodendrocytów.

W drugiej części pracy podjęto się wyjaśnienia pochodzenia ewolucyjnego kluczowych dla funkcjonowania oligodendrocytów białek: MBP, MOG i FTH. Analizy wykonano typowymi metodami bioinformatycznymi – poprzez porównania filogenetyczne i modelowanie potencjalnych właściwości katalitycznych białek

Uzyskane wyniki pozwalają postawić hipotezę, że różnorodne grupy ferrytyn, obserwowane u strunowców pochodzą od jednego, wspólnego białka. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwoliły również zaproponować nową klasyfikację ferrytyn, opartą o ich potencjalne właściwości katalityczne i pochodzenie ewolucyjne.

Dla białka MBP wyniki pozwalają postawić hipotezę, że powstało ono na skutek fuzji dwóch fragmentów odrębnych genów.

W przypadku MOG nie potwierdzono hipotezy o jego potencjalnym pochodzeniu od jednego z białek z rodziny butyrofilin. Wyjaśniono również obserwacje, wskazujące na zróżnicowaną ekspresję tego białka w poszczególnych grupach ssaków – tylko w mózgu w wypadku człowieka i pozostałych naczelnych oraz w mózgu i narządach obwodowych u innych grup ssaków, w tym gryzoni. Czynnikiem odpowiedzialnym za te różnice są polimorfizmy sekwencji promotorów genu *MOG* u poszczególnych grup zwierząt.

Abstract

Oligodendrocytes are the most numerous glial cells of the nervous system. Their main function is to protect neurons, provide metabolic support for nerve cells, accumulate iron necessary for biochemical processes occurring in all cells of the nervous system and provide them with a shield necessary for proper conduction of impulses in neurons. In this paper, the morphometric and morphological analysis of oligodendrocytes in three areas of the human and canine brains was performed: hippocampus, lobus frontalis and corpus callosum. Based on standard and special histological studies, morphological and morphometric analysis of oligodendrocytes in selected areas of the human and canine brains was performed.

The obtained results indicate the lack of significant morphological differences between the two species, confirming that the process of myelination itself is an evolutionarily stable phenomenon in most groups of vertebrate animals. The results of this part of the work also confirm that the dog can be a natural model of diseases associated with damage to oligodendrocytes.

In the second part of the work, an attempt was made to explain the evolutionary origin of the proteins crucial for the functioning of oligodendrocytes: MBP, MOG and FTH. Analyzes were performed using typical bioinformatics methods – phylogenetic comparisons and modeling of potential catalytic properties of proteins

The obtained results allow us to hypothesize that the various groups of ferritins observed in chordates come from one common protein. The results of the analyzes also allowed to propose a new classification of ferritins, based on their potential catalytic properties and evolutionary origin.

For the MBP protein, the results allow us to hypothesize that it was formed as a result of the fusion of two fragments of separate genes.

In the case of MOG, the hypothesis of its potential origin from one of the proteins of the butyrophyllin family has not been confirmed. Observations indicating differential expression of this protein in particular groups of mammals were also explained - only in the brain in the case of humans and other primates, and in the brain and peripheral organs in other groups of mammals, including rodents. The factor responsible for these differences are polymorphisms of MOG gene promoter sequences in particular groups of animals.

Część wyników uzyskanych w niniejszej dysertacji została zaprezentowana w następującej publikacji:

Golan MP, Piłsyk S, Muszewska A, Wawrzyniak A. **Ferritins in *Chordata*: Potential evolutionary trajectory marked by discrete selective pressures: History and reclassification of ferritins in chordates and geological events' influence on their evolution and radiation.** Bioessays. 2021 Jan;43(1):e200020

I. Wstęp

I.1 Historia badań nad oligodendrocytami

W latach 50-tych XIX wieku Rudolf Virchow analizując strukturę mózgu, stwierdził, że poza astrocytami w „Nervenkitt” jest więcej typów komórek, ale z powodu niedoskonałych metod barwienia nie można było dokonać ich dokładnej charakterystyki i zostały nazwane „trzecim elementem” (Somjen, 1988; Rosenbluth, 1999). Kilkadziesiąt lat później Pío del Río-Hortega (1921) zastosował metodę barwienia z użyciem węgla srebra, dzięki czemu wskazał nowe, nieznane właściwości neurogleju. W swoich pracach wykazał, że komórki glejowe zawierają liczne, krótkie wypustki i określił je mianem oligodendrogleju oraz mikrogleju. Cechami definiującymi oligodendrocyty (OLG) były ich małe ciała komórkowe, z jądrem obfitującym w chromatinę oraz wypustki bez włókien, wypełnione ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Zastosowanie impregnacji solami srebra umożliwiło obserwację ogromnej złożoności wypustek tych komórek. Na podstawie badań z użyciem soli srebra, Pío del Río-Hortega był w stanie rozróżnić cztery typy tych komórek:

- OLG typu I, wytwarzające wiele różnych segmentów mieliny na aksonach o małej średnicy w różnych kierunkach;
- OLG typu II podobne pod względem wielkości i liczby do typu I, ale z segmentami mieliny biegnącymi równolegle do siebie;
- OLG typu III towarzyszące mniejszej liczbie aksonów o większej średnicy;
- OLG typu IV posiadające ciało komórkowe ściśle przylegające do jednego, bardzo dużego aksonu, w układzie podobnym do komórek Schwanna.

Obraz barwienia OLG potwierdził, że niektóre ich wypustki przebiegały równolegle do aksonów i wydawały się pokrywać aksony „mieliną”. Termin „mielina” został wprowadzony przez Rudolfa Virchowa już w 1858 roku, na długo przed poznaniem dokładnego jej pochodzenia i funkcji (Rosenbluth, 1999). Praca Penfielda (1924) ugruntowała pogląd, że główną rolą OLG jest tworzenie mieliny, chociaż mielinizacja nie była uważana za ich jedyną funkcję. W istocie szarej ośrodkowego układu nerwowego (OUN) opisano frakcję OLG, które nazwano „okołonerwowymi” komórkami satelitarnymi. Kontaktowały się z perikarionami neuronów, co sugerowało inny rodzaj zależności pomiędzy tymi komórkami. Niektóre rodzaje oligodendrogleju towarzyszyły małym naczyniom i dlatego zostały sklasyfikowane jako „satelity okołonaczyniowe”.

Głównym odkryciem, potwierdzającym teorię o roli OLG w wytwarzaniu mieliny, była ich duża liczba w traktach istoty białej OUN, ich pojawianie się w fazie rozwoju, w czasie mielinizacji oraz położenie w pobliżu osłonek mielinowych. Co ciekawe, duża liczba granulek w cytozolu OLG, przypominająca komórki gruczołów wydzielniczych, została również uznana za dowód ich funkcji w tworzeniu osłonek mielinowych. Początkowo mielina nie była uważana za przedłużenie błony plazmatycznej OLG, ale raczej za tłuszczową substancję aksonalną wydzielaną do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Rosenbluth, 1999). Znaczenie „cylindra aksonów” w przekazywaniu impulsów chemicznych zostało dobrze poznane, ale przełomem okazała się praca Betty Ben Geren (1954), wykorzystująca mikroskopię elektronową (EM) w obwodowym układzie nerwowym (PNS) piskląt. W swojej pracy wykazała, że mielina nie jest pochodzenia aksonalnego, ale stanowi ciągłe błoniaste rozszerzenie komórek Schwanna. Podobny związek, ze spiralnym owinięciem glejowej błony plazmatycznej wokół aksonu, został potwierdzony dla OLG w OUN (Bunge 1968; Hildebrand i wsp., 1993). Wszystkie te prace radykalnie zmieniły sposób postrzegania OLG i mieliny z amorficznego „Nervenkitz” w fascynujący obiekt badań biologii komórki.

OLG w historii ewolucyjnej kręgowców, pojawiły się po raz pierwszy u ryb, jednak najwięcej badań nad ich strukturą i funkcją dotyczyło ssaków (Hines, 2021).

I.2 Funkcja oligodendrocytów

Większość OLG posiada od 20 do 60 wypustek o długości około 20–200 μm (Hildebrand i wsp., 1993; Chong i wsp., 2012). Szacunkowa powierzchnia jednego OLG wynosi około $5\text{--}50 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, co stanowi największy obszar spośród wszystkich komórek organizmu (Pfeiffer i wsp., 1993; Baron i Hoekstra 2010). Proces mielinizacji pojedynczych segmentów aksonów pomimo, że zajmuje tylko sześć do dziewięciu godzin, jest energochłonny (Czopka i wsp., 2013).

Oślonka mielinowa przylegająca do aksonu, nigdy nie uzyskuje zwartej struktury, ale kończy się w paranodalnych pętlach. Tworzą one połączenia przegrodowe z powierzchnią aksonów, utrzymywane razem przez białka adhezyjne i kontaktyne po stronie aksonów oraz neurofascynę-155 na powierzchni komórki glejowej. W regionie intermodalnym (pomiędzy dwoma domenami paranodalnymi), najbardziej wewnętrzne blaszki osłonki mielinowej pozostają mało zwarte, tworząc przedział cytoplazmatyczny części adaksonalnej systemu kanałów mielinowych. Jest on zwrócony w stronę przestrzeni okołaksonalnej na całej swojej długości. Taka konformacja jest optymalna dla poprawnej komunikacji z neuronem (Salzer i wsp., 2008).

I.3 Budowa mieliny i jej kluczowe białka

Oprócz unikatowej ultrastruktury, mielina posiada kilka wyjątkowych cech, do których, między innymi dwukrotnie niższe uwodnienie względem oplatanego aksonu. Drugą unikatową cechą jest jej skład molekularny, ponieważ mielina zawiera 70%-80% lipidów oraz niewielki zestaw białek, z których najliczniej reprezentowane jest białko zasadowe mieliny (MBP) oraz proteolipidowe białko mieliny (PLP). Badania proteomu mieliny wykazały obecność również innych białek o niskiej masie cząsteczkowej, specyficznych tylko dla OLG (Werner i wsp., 2007; Ishii i wsp., 2009; Patzig i wsp., 2011; Manrique-Hoyos i wsp., 2012). Cechą wyróżniającą mielinę jest niezwykła stabilność ultrastruktury, dowodem czego są prace badaczy, dotyczące m. in. mózgowia Tyrolskiego Człowieka Lodu datowanego na około 5000 lat (Hess i wsp., 1998). Za stabilność mieliny odpowiedzialny jest jej skład lipidowy błon z wysokim poziomem nasyconych, długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, glikosfingolipidów (~20%) oraz cholesterolu (~40% procent wszystkich lipidów) (Coetzee i wsp., 1996). Ponadto mielina zawiera wysoki odsetek plazmalogenów (eterolipidów) (do 15%) z nasyconymi długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi (Chrast i wsp., 2011). Oddziaływania dyspersyjne Van der Waalsa, które są generowane przez interakcję między grupami metylenowymi długich i nasyconych łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych, stanowią główne siły, które utrzymują te cząsteczki razem. Zwiększona gęstość upakowania lipidów w mielinie jest dodatkowo warunkowana przez grupy hydroksylowe przy atomie 2-C reszt galaktozyloceramidu i sulfatydu wprowadzane przez 2-hydroksylazę kwasów tłuszczowych (FA2H) (Zoller i wsp., 2008).

Po zakończeniu mielinizacji, ważne dla rozwoju osłonek mielinowych kanały cytozolowe zmniejszają się pozostając istotnym przedziałem luźnej mieliny. Efekt ten można obserwować przy użyciu mikroskopii krioelektronowej (CEM) lub metodą immunofluorescencyjną (IF). Opisana powyżej przestrzeń cytozolowa łączy dojrzałe ciało oligodendrogleju z najbardziej wewnętrznym wierzchołkiem wypustki OLG. „Kanał mielinowy”, przypominający rurkę - przedział cytozolowy (nazywany „wargą wewnętrzną”), biegnący równoległe do cienkiej zewnątrzkomórkowej przestrzeni okołoaksonalnej, zwrócony jest do międzywęźla aksonów wzdłuż swojej długości (Nave, 2010). Wypełniony jest całym szeregiem rozpuszczalnych i związanych z błoną białek mielinowych (Roth i wsp., 2006; Werner i wsp., 2007; Ishii i wsp., 2009; Jahn i wsp., 2009). Badania z użyciem EM wykazały obecność mikrotubul i ciał wielopęcherzykowych w kanale mielinowym (głównie w pętłach paranodalnych i

nacięciach mieliny Schmitta-Lantermana). Sugeruje to, że w tym przedziale motoryczne procesy transportowe utrzymują się przez całe dorosłe życie. Struktura luźnej mieliny zachowuje funkcjonalną integralność aksonów, ponieważ zwarta mielina nie tylko izoluje elektrycznie aksony, ale także osłania przedział aksonów i ogranicza szybki dostęp do metabolitów z przestrzeni pozakomórkowej (Jahn i wsp., 2009) .

I.4 Dysfunkcje mieliny

Zaburzenia w budowie struktury mieliny mogą powodować późną degenerację aksonów, a nawet przedwczesną śmierć. Wykazano to w badaniach na mutantach myszy, u których brak białek specyficznych dla mieliny. Mutacje te powodują dysmielinizację, zaburzenia w rozwoju mózgowia oraz skrócony kilkukrotnie okres życia. Obecność zakotwiczonej w błonie cyklicznej fosfodiesterazy CNP1 zapobiega przedwczesnemu zagęszczaniu mieliny podczas rozwoju, nie zmieniając procesu mielinizacji, natomiast jej brak związany jest z problemami wtórnego transportu aksonalnego po zakończeniu samego procesu (Griffiths i wsp., 1998). Jednym z mechanizmów, przyczyniających się do tego zjawiska może być wadliwe zamykanie kanałów mielinowych przez nieprawidłowe „zagęszczanie”, bezpośrednio lub pośrednio zakłócające wydajne sprzężenie metaboliczne OLG i aksonów. Dysfunkcja ta może być wynikiem deficytu energetycznego aksonów, podczas której następuje rozległa utrata aksonów i przedwczesna śmierć neuronów myszy (Lappe-Siefke i wsp., 2003; Edgar i Nave 2009). U heterozygotycznych mutantów myszy nawet o 50% zmniejszona ekspresja CNP1 zakłóca długoterminowe utrzymywanie traktów istoty białej, w konsekwencji prowadząc do utraty aksonów i stanu zapalnego w układzie nerwowym u dorosłych osobników (Hagemeyer i wsp., 2012).

Kolejną ważną funkcją OLG jest wsparcie metaboliczne neuronów (Fünfschilling i wsp., 2012, Lee i wsp., 2012, Saab i wsp., 2016). Uszkodzenia mieliny w OUN związane są z różnymi chorobami neurologicznymi oraz neurodegeneracyjnymi (Nave i Ehrenreich, 2014). Starzejący się mózg wykazuje subtelne, rozległe pogorszenie stopnia mielinizacji (Peters, 2009;). Dotychczasowe badania dotyczyły głównie nieprawidłowości dysfunkcji istoty białej OUN u gryzoni i ograniczały się w dużej mierze do diagnozy oraz oceny obniżonych funkcji motorycznych. Wykazano, że OLG mogą mielinizować aksony w sposób zależny od ich aktywności i wpływać na ich szybkość przewodnictwa nerwowego (Hines i wsp., 2015). W wysoce wyspecjalizowanych włóknach pnia mózgu, grubość i długość międzywęzła aksonalnych ma kluczowe znaczenie dla rozprzestrzeniania się impulsów z dokładnością submilisekundową, natomiast prędkość

ich przewodzenia jest precyzyjnie kontrolowana dzięki mielinizacji (Seidl i wsp., 2016). Co ciekawe, mielina kory mózgu ma gęstość niższą niż w pozostałych obszarach mózgowia (Tomassy i wsp., 2016; Micheva i wsp., 2016) i nie wiadomo, jak potencjalne zmiany w mielinizacji mogłyby wpłynąć na przewodzenie impulsów nerwowych.

I.5 Najważniejsze białka oligodendrocytów – mielinowe białko zasadowe

MBP jest jednym z kluczowych składników w tworzeniu osłonek mielinowych OUN, przy czym jego izoforma o masie 18,5 kDa jest najliczniej reprezentowana (Han i wsp., 2013). Liczne izoformy MBP wykazują się różnorodnością cząsteczkową, wynikającą z modyfikacji potranslacyjnych, w tym deiminacji w wyniku której powstaje pula wariantów cytrulinowanych o zmniejszonym dodatnim ładunku netto (Beniac i wsp., 1999). Wysoki dodatni ładunek netto MBP jest związany z nieuporządkowaną konformacją MBP, co pozwala na interakcję z bogatą w fosfolipidy cytoplazmatyczną powierzchnią błon mielinowych. Takie ścisłe oddziaływanie skutkuje neutralizacją ładunku, fałdowaniem i częściową insercją błony (Vassal i wsp., 2015). MBP promuje układanie się osłonki mielinowej i tworzenie głównej gęstej linii (MDL), która w stanach demielinizacyjnych np. w stwardnieniu rozsianym (SM) i neuropatiach demielinizacyjnych jest zaburzona przestrzennie (Dupouey i wsp., 1979, Privat i wsp., 1979).

MBP opisywane jest głównie ze względu na swoje właściwości autoantygenowe w SM, a główny immunodominujący epitop MBP, związany z kompleksem receptora limfocytów T, został scharakteryzowany pod względem strukturalnym (Li i wsp., 2005, Vassal i wsp., 2015). Charakter autoantygenowy, wynikający z podatności MBP na proteolizę, jest zależny od składu lipidów (Vassal i wsp., 2015, Shaharabani i wsp., 2016). Deiminacja, zmieniając strukturę i funkcję MBP powoduje obniżoną stabilność mieliny oraz zwiększoną podatność na proteolizę. Tryb asocjacji błon, struktura i stabilność MBP muszą być brane pod uwagę podczas badania mechanizmów molekularnych działania MBP (Pritzker i wsp., 2000, D'Souza i Moscarello, 2006). MBP tworzy uporządkowaną, samoorganizującą się siatkę białkową antyrównoległych lub ułożonych w stos cząsteczek z ograniczonym stopniem swobody pomiędzy warstwami cytoplazmatycznymi mieliny (Shaharabani i wsp., 2016). Ta siatka białkowa stabilizuje warstwy mieliny, podczas gdy białko mieliny P2 jest najprawdopodobniej zaangażowane w stabilizację samej siatki i jest niezbędne do prawidłowego przebiegu mielinizacji (Suresh i wsp., 2010; Knoll i wsp., 2014). Badania powierzchniowe właściwości adsorpcyjnych MBP wykazały, że białko to wiąże się z powierzchnią błony przed

zwinięciem do docelowej konformacji adhezyjnej. Model ten powstał na podstawie wcześniejszych badań tych samych autorów, opisujących właściwości izoelektryczne MBP (Lee i wsp., 2014; Lee i wsp., 2015).

MBP wykazuje się zmienną długością, zależną od translacji wyrażanych izoform transkryptu *MBP*, którego obecność zależy od stadium rozwoju osobniczego (Siu i wsp., 2015). W rozwoju embrionalnym oraz wieku podeszłym, w OLG dominuje długa izoforma Golli-MBP (genes of the oligodendrocyte lineage), dłuższa z N-końca, natomiast w ciągu dorosłego życia dominuje klasyczna, krótka forma MBP.

I.6 Najważniejsze białka oligodendrocytów – mielinowa glikoproteina oligodendrocytów

Mielinowa glikoproteina oligodendrocytów (MOG) to białko transmembranowe, odgrywające ważną rolę w procesie mielinizacji oraz w obrębie OUN, produkowane wyłącznie przez OLG. Pojedyncza zewnątrzkomórkowa domena MOG przyjmuje zmienną konfigurację złożonej immunoglobuliny (Ig), utworzoną przez dwie antyrównoległe β -kartki, otaczające hydrofobowy rdzeń (Breithaupt i wsp., 2003; Brilot i wsp., 2009). U ludzi MOG służy jako niezbędna „cząsteczka adhezyjna” zapewniająca integralność strukturalną osłonki mielinowej, natomiast pojawia się późno w trakcie rozwoju OLG (podstawowa funkcja molekularna MOG nie jest jeszcze dobrze poznana). Prawdopodobnie jego rola polega na ukończeniu i/lub utrzymaniu struktury osłonki mielinowej). Inne koncepcje zakładają, że MOG jest konieczny jako cząsteczka adhezyjna na powierzchni osłonki mielinowej w OUN, aby zapewnić jej integralność strukturalną (Chen i wsp., 2018).

I.7 Białko odpowiedzialne za gospodarkę żelazową w oligodendrocytach - ferrytyna

Ferrytyny (FT) to oligomeryczne białka tworzące klatki magazynujące żelazo, zaangażowane w transport oraz zarządzanie równowagą żelaza i tlenu u zwierząt, roślin i mikroorganizmów. FT należą do rodziny białek karboksylaz żelaza, które są zdolne do koncentracji jonów żelaza (do 4500 atomów w każdej klatce) w postaci biodostępnych, nietoksycznych i rozpuszczalnych form tlenku żelaza $Fe_2O_3(H_2O)_n$ (Andrews 2010).

Klatka FT składa się z samoorganizujących się 24 podjednostek sparowanych homologicznych białek FT w zmiennych proporcjach. U kręgowców występują trzy takie podjednostki (łańcuchy), klasyfikowane zależnie od masy cząsteczkowej: ciężkie (H), średnie (M) i lekkie (L), każdy wielkości ok. 20 kDa. Oligomeryzują one parami przyjmując razem postać struktury klatki 12-ściennej (dodekahedralnej; każda „ściana” jest dimerem) (Andrews, 2010) o masie cząsteczkowej około 480 kDa (Linder i wsp.,

1989; Linder 2013). W mięśniu sercowym oraz szkieletowym stwierdzono również cięższą izoformę klatki, złożoną z 36 podjednostek FT. (Vulimiri i wsp. 1977, Linder i wsp., 1981, Linder i wsp., 1989).

FT obecne są niemal we wszystkich grupach organizmów, chociaż kręgowce wykazują najszersze ich zróżnicowanie. Niewiele wiadomo na temat lokalizacji komórkowej i tkankowej oraz dystrybucji mniej znanych form FT, chociaż opisano ich ekspresję tkankową dla kilku gatunków ssaków oraz żab. U żab ekspresję genu kodowanego przez FTM wykryto w wątrobie, natomiast geny kodujące formy transportowe FTH i FTL ulegały ekspresji we wszystkich krwinkach (Dickey et al. 1987). Izoformy podjednostek FT mogą w różny sposób składać się w zależności od tkanki oraz miejsca występowania. W narządach, w których występuje retencja żelaza np: śledziona, wątroba (Brown i wsp., 1979, Kim i wsp., 2011) dominuje izoforma FTL, natomiast w sercu (Kim i wsp., 2011), zębie (Wen i Paine 2013), w mózgu (głównie w neuronach i OLG) dominującą formą jest FTH (Sanyal i wsp., 1996, Todorich i wsp., 2011, Reinert i wsp., 2019). Zmienny skład podjednostkowy związany jest z różnym zapotrzebowaniem na tlen i żelazo. OLG to główne komórki OUN magazynujące żelazo, niezbędne dla kluczowych procesów metabolicznych mózgu, odpowiedzialne za proces mielinizacji, ochronę i metabolizm włókien nerwowych oraz wspomaganie wydłużania aksonów (Simons i Nave, 2015). Stężenie żelaza w OLG jest pięciokrotnie wyższe niż w neuronach, natomiast w mikrogleju oraz astrocytach odpowiednio trzy i dwukrotnie wyższe (Reinert i wsp., 2019).

1.8 Badania nad ewolucją układu nerwowego

Od czasu Darwina badanie ludzkich procesów poznawczych zostało umieszczone w kontekście ewolucyjnym. Aby zrozumieć działanie umysłu ludzkiego, czyli pozyskiwanie, przetwarzanie, przechowywanie informacji oraz w jaki sposób na nią reagujemy, należy uwzględnić proces ewolucji i presję selekcyjną, która ukształtowała naszych przodków. Jednym ze sposobów na osiągnięcie tego celu jest porównanie różnic i podobieństw na poziomie pomiędzy istniejącymi gatunkami w procesach poznawczych i leżących u ich podstaw struktur neuroanatomicznych. Takie podejście wymaga zrozumienia relacji filogenetycznych między gatunkami, aby wywnioskować zmiany ewolucyjne, które miały miejsce w przeszłości. Małpy człekokształtne są najbliższymi żyjącymi krewnymi współczesnego człowieka i dlatego stanowiły istotny model dla badań porównawczych. Ograniczenia, związane z etycznymi praktykami pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi oraz fakt, że większość człekokształtnych to gatunki

zagrożone, wpłynęło to na zakaz większości badań z ich wykorzystaniem (Carvalho i wsp., 2019). Badanie struktury mózgowia wymarłych zwierząt uniemożliwia fakt, że tkanka nerwowa bardzo rzadko ulega fosylizacji, a dostępne artefakty nie pozwalają na ich pełną analizę (Gramling, 2016).

Inną metodą pozyskiwania informacji o mózgowiach wymarłych zwierząt jest modelowanie ich kształtu na podstawie zachowanych kości mózgowcowej (Muller i wsp., 2021). Ograniczenia te sprawiają, że pośrednia metoda porównawcza jest jednym z najpotężniejszych dostępnych narzędzi, oraz ważnych informacji na temat ewolucji ludzkiego zachowania i procesów poznawczych (Goodall, 1990, Sherwood i wsp., 2008).

Wzrost wielkości mózgu człowieka wynika głównie z ekspansji kory nowej (*neocortex*) zwłaszcza heteromodalnych regionów asocjacyjnych płatów: czołowego (*lobus frontalis*), skroniowego (*lobus temporalis*) i ciemieniowego (*lobus parietalis*). Ewolucja kory asocjacyjnej człowieka obejmowała zróżnicowane powiększenie regionów homologicznych u innych naczelnych. Doprowadziło to do zróżnicowania nowych, funkcjonalnie odrębnych obszarów, które odpowiadają za precyzyjne przetwarzanie informacji (Finlay i Darlington, 1995).

I.9 Budowa mózgowia ssaków

Półkula mózgu ssaków podzielona jest na pięć płatów: czołowy, ciemieniowy, skroniowy, potyliczny oraz wyspę (Bui i wsp, 2021; Uddin i wsp., 2006). Dwie umowne linie podziału wyznaczają granice obszarów anatomicznych w mózgu. Pierwsza to pionowa linia od bruzdy ciemieniowo-potylicznej do wcięcia przedpotylicznego (Bui i wsp., 2021). Druga linia rozciąga się od tylnej gałęzi bruzdy bocznej, która styka się z pierwszą linią pionową (Bui i wsp., 2021). Dwie linie i trzy główne bruzdy (środkowa, boczna i ciemieniowo-potyliczna) dzielą półkulę mózgową na pięć płatów. Płat czołowy leży przed bruzdą środkową i powyżej bruzdy bocznej (Bui i wsp, 2021; Uddin i wsp., 2006; Jin i wsp, 2016; Nishikuni i Ribas, 2013)). Płat ciemieniowy jest ograniczony od przodu przez bruzdę środkową, od tyłu przez pionową linię umowną (łąączącą bruzdę ciemieniowo-potyliczną i wcięcie przedpotyliczne), a od dołu przez poziomą linię umowną - rozciągającą się od tylnego ramienia bruzdy bocznej do pierwszego płata (Jin i wsp., 2016; Ribas, 2010; Nishikuni i Ribas, 2013; Javed i wsp, 2020).

Cechą charakterystyczną kory nowej - *neocortex* jest jej sześciowarstwowa organizacja, którą można obserwować na poziomie mikroskopu świetlnego:

- warstwa I molekularna (splotowata) składa się z wierzchołkowych kępek dendrytycznych neuronów piramidalnych, poziomo zorganizowanych aksonów, komórek Cajala-Retziusa oraz komórek glejowych.
- warstwa II ziarnista zawiera głównie komórki ziarniste oraz małe komórki piramidalne.
- warstwa III piramidalna zewnętrzna składa się z małych i średnich komórek piramidalnych i można ją podzielić na podwarstwę: IIIa, IIIb i IIIc.
- warstwa IV ziarnista wewnętrzna zawiera małe okrągłe komórki ziarniste (kolczaste gwiaździste i kolczaste interneurony) oraz małe komórki piramidalne.
- warstwa V piramidalna wewnętrzna zawiera największe komórki piramidalne, ich aksony opuszczają korę i docierają do obszarów podkorowych. Warstwa ta podobnie jak warstwa III podzielona jest na 3 podwarstwy: Va, Vb i Vc.
- warstwa VI wielopostaciowa (polimorficzna) w której występują komórki pobudzające (kolczaste komórki gwiaździste, piramidalne, odwrócone neurony piramidalne, komórki dwubiegunowe/wrzecionowate oraz o atypowych kształtach) oraz interneurony hamujące. Warstwa ta jest podzielona na podwarstwy: VIa i VIb.

Hipokamp (*Hippocampus*) (Hip) stanowi starszy ewolucyjnie obszar mózgowia, zaliczany do kory starej (Braak, 1974), jest częścią płata limbicznego położoną w przyśrodkowej części płata skroniowego. Formacja hipokampa (*Formatio hippocampi*) obejmuje nawleczkę szarą (*Indusium griseum*), prążek podłużny (*Stria longitudinalis*), zakręt tasiemczkowaty (*Gyrus fasciolaris*), hipokamp właściwy, który obejmuje róg Amona (*Cornu Ammonis*), zakręt zębaty (*Gyrus dentatus*) (GD), podkładkę (*Subiculum*) oraz część haka (*uncus*) (Tatu i Vuillier, 2014; Knierim, 2015; Ten Donkelaar i wsp., 2018). Histologicznie GD składa się z trzech warstw: molekularnej, ziarnistej oraz polimorficznej (Wilczyńska i wsp., 2018, Ho i wsp., 2013). Najczęściej stosowany jest podział Hip wg Lorente de Nó (de Nó 1934) na: róg Amona (*Cornu Ammonis*) - odpowiednik hipokampa właściwego (*Hippocampus proper*), składający się z czterech pól: CA1, CA2, CA3, CA4. Pole CA4 stanowi odpowiednik wnęki zakrętu zębatego (*hilus*). Największą częścią jest pole CA1, zawierające do 90% neuronów piramidowych (Mercer i Thompson, 2017; Mazher i Hassan, 2021; Lacaille i Schwartzkroin, 1988). Pola Hip budują cztery warstwy: początkowa (*stratum oriens*) (SO), piramidalna (*stratum pyramidale*) (SP), promienista (*stratum radiatum*) (SR) oraz jamisto-drobinowa (*stratum lacunosum - moleculare*) (SLM). SO zawiera grupy hamujących interneuronów z dwoma rodzajami komórek koszykowych. SP tworzy główny składnik komórkowy *cornu*

Ammonis, w której lokalizuje się 10–30 warstw komórek piramidalnych. Funkcjonalnie komórki piramidalne są pobudzające, mają wierzchołek skierowany w stronę zewnętrznej warstwy drobinowej, a podstawę skierowaną w stronę koryta hipokampa (*alveus of hippocampus*). Warstwa SR zawiera wierzchołkowe dendryty komórek piramidalnych i niektóre komórki gwiaździste, natomiast warstwa SLM zawiera aksony i interneurony. Hip jest regionem naszego mózgu, który odgrywa ważną rolę w procesach takich, jak pamięć i uczenie się. Zaangażowany jest w przetwarzanie pamięci, przekształcanie pamięci krótkotrwałej w pamięć długotrwałą, nawigację przestrzenną oraz emocje. Odgrywa również kluczową rolę w emocjach i zachowaniach człowieka.

Ciało modzelowate (*Corpus callosum*) (CC) to główny obszar spoidłowy mózgu składający się z dróg istoty białej, które łączą lewą i prawą półkulę mózgową. Zawiera około 200 milionów silnie zmielinowanych włókien nerwowych, które tworzą homotopowe lub heterotopowe projekcje do przeciwległych neuronów w tej samej warstwie anatomicznej. W okresie niemowlęcym CC szybko się rozszerza z powodu wzrostu liczby aksonów, ich średnicy oraz mieliny. Chociaż rozwój CC zakończony jest w wieku czterech lat, to dalszy wzrost trwa do trzeciej dekady życia w wolniejszym tempie (Tanaka – Arakawa i wsp., 2015) Anatomicznie od przodu do tyłu CC składa się z: części środkowej czyli pnia (*truncus corporis callosi*), części tylnej czyli płata (*splenium corporis callosi*), miejsca zagięcia pnia CC czyli kolana (*genu corporis callosi*) oraz najbardziej przedniej część CC czyli dzioba (*rostrum corporis callosi*). Ze względu na anatomiczne położenie, CC jest silnie związany ze sklepieniem i komorami bocznymi. W połączeniu ze sklepieniem CC tworzy fizyczną barierę oddzielającą dwie komory boczne (Musiek, 1986). Podstawową funkcją CC jest integracja i przekazywanie informacji z obydwu półkul mózgowych, w celu przetwarzania sygnałów czuciowych, motorycznych i poznawczych (Tzourio-Mazoyer, 2016).

I.9 Badania nad ewolucją i chorobami mózgu – wykorzystywane modele

Większość badań biomedycznych przeprowadza się z wykorzystaniem myszy (*Mus musculus*) i szczurów (*Rattus norvegicus*). Ich krótki okres życia oraz ograniczenia anatomiczne sprawiają, że nie są idealnym modelem chorób cywilizacyjnych i wieku podeszłego (van der Worp i wsp., 2010; Moran i wsp., 2016). Przyczynia się to do poszukiwania alternatywnych modeli, odzwierciedlających wpływ cywilizacji na organizm o dłuższym okresie życia. Pies został udomowiony w końcowej fazie Epoki Lodowcowej (Lahtinen i wsp., 2021). Przez lata psy były obiektem badawczym biologów i lekarzy. Wiele kluczowych odkryć zostało dokonanych w doświadczeniach na psach -

np. badanie Pawłowa dotyczące łuku odruchowego, odkrycie przez Pasteura szczepionki przeciwko wściekliźnie (Franco, 2013). Przez wiele lat uważano, że pies jest idealnym modelem dla części chorób człowieka, ze względu na jego długi okres życia i przebywanie w tym samym, antropogennym, środowisku. Wielopokoleniowy wpływ człowieka na psa powodował i utrwał zmiany w jego genomie. Tym samym pies jest narażony na takie same czynniki środowiskowe i choroby cywilizacyjne co człowiek (Kaminski i wsp., 2019; Youssef i wsp., 2016; Chandler i wsp., 2017). Linie ewolucyjne naczelnych i psowatych rozdzieliły się około 30 mln lat temu (Nyakatura i Bininda-Emonds, 2012). Psokształtne (*Caniformia*) stanowią takson szeroko rozpowszechniony na Ziemi o dużej plastyczności molekularnej genomów, a do sukcesu ewolucyjnego psowatych przyczynił się również fakt ich szybkiego dostosowania do nowych środowisk i relatywnie duże mózgowie (Liow i Finarelli, 2014; Finarelli i Flynn, 2009).

II. Cel pracy

Komórki glejowe w układzie nerwowym są niezmiernie interesujące ze względu na swoją różnorodność budowy i funkcji. Neuroglej wpływa na podstawowe funkcje neuronów, chociaż sam nie ma możliwości przewodzenia impulsów nerwowych i tworzy rusztowanie w układzie nerwowym. Niezależnie od liczbowego stosunku gleju do neuronów, naukowcy udowodnili, że neuroglej jest funkcjonalnie istotną częścią mózgowia. OLG wydają się odgrywać istotną rolę w OUN, a ich znaczenie nie do końca jest jeszcze poznane. W pracach opisujących OLG brak doniesień, które w ujęciu porównawczym przedstawiałyby analizę morfologiczną, gęstość oraz rozmiar tych komórek u człowieka i psa oraz brak informacji odnoszących się do analizy bioinformatycznej markerów OLG, w ujęciu ewolucyjnym. Do badań wybrano obszary mózgowia człowieka (*Homo sapiens*) i psa (*Canis lupus familiaris*) oraz postanowiono dokonać analizy morfologicznej OLG, w trzech obszarach mózgu:

- płata czołowego (*lobus frontalis*) (LF) stanowiącego część kory nowej (*neocortex*), która pojawia się w procesie ewolucji dopiero u ssaków (Kaas, 2006) i uważana jest za jeden z kluczowych składników sukcesu ewolucyjnego ssaków,
- hipokampa (*hippocampus*) (Hip), będącego częścią kory starej (*paleocortex*), występującego już u niższych kręgowców, ale stanowiący istotny element procesów pamięci epizodycznej, nawigacji przestrzennej i procesów uczenia się (Allen i Fortin, 2013)

- spoidła wielkiego (*corpus callosum*) (CC), struktury, łączącej półkule mózgu u ssaków, przez którą przebiega wiele szlaków nerwowych. CC jest również najsilniej zmielinizowaną strukturą mózgowia.

Analizy filogenetyczne stanowią powszechnie używane narzędzie w biologii ewolucyjnej i pozwalają na próby przybliżonego określenia, zarówno pochodzenia poszczególnych genów/białek, jak i pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt, dlatego podjęto próbę oceny określenia historii ewolucyjnej OLG, poprzez analizę pochodzenia białek, kluczowych dla ich funkcji.

Głównym celem podjętych badań była:

- analiza porównawcza lokalizacji i morfologii OLG w mózgowiu człowieka i psa
- potwierdzenie lokalizacji OLG z użyciem przeciwciała przeciwko mielinowemu białku zasadowemu w mózgowiu człowieka i psa
- porównanie parametrów morfometrycznych OLG w mózgu człowieka i psa
- analiza bioinformatyczna markerów OLG kręgowców, pokazująca ich pochodzenie i rozwój w procesie ewolucji
- bioinformatyczna analiza podobieństw i różnic markerów OLG pomiędzy psem i człowiekiem

III. Materiały i metody

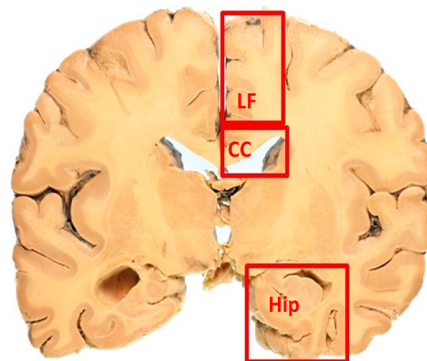
III.1 ANALIZA HISTOLOGICZNA

III.1.1 Wykorzystany w badaniach materiał biologiczny

Do badań wybrano mózgi pochodzące od ludzi oraz psów. Mózgi ludzkie pochodziły z kolekcji Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii (IPiN) w Warszawie. Zebrana grupa obejmowała przypadki mężczyzn i kobiet (po 5 osób), w przedziale wiekowym 65 – 75 lat. Mózgi poddane zostały badaniu neuropatologicznemu w IPiN, w celu wykluczenia zmian chorobowych i ewentualnych zaników tkanki nerwowej. Z badania wykluczono osoby, które nadużywały alkoholu, wykazywały wcześniejsze urazy mechaniczne głowy i pochodziły ze środowiska, w którym występowała przemoc domowa. Materiał ludzki pobrany został zgodnie z przepisami regulującymi korzystanie z tkanek ludzkich za zgodą wydaną przez Lokalną Komisję Bioetyczną przy Instytucie Psychiatrii i Neurologii nr 28/2021. Mózgi psów (*Canis familiaris*) samców i samic (po 5 osobników) pochodziły z kolekcji Zakładu Anatomii Patologicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Mózgi psów pobierane były po śmierci, zgodnie z przepisami regulującymi korzystanie z tkanek poubojowych, za zgodą wydaną przez II Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie nr 78/2014.

Mózgowie pochodzące od ludzi i psów sfotografowano, a do badań wybrano następujące obszary:

1. hipokamp (*hippocampus*) – Hip z zakrętem zębatym (*gyrus dentatus*)
2. spoidło wielkie (*corpus callosum*) - CC
3. oraz fragment płata czołowego (*lobus frontalis*) - LF wraz z zakrętem obręczy (*gyrus cinguli*) (Ryc.1.)



Rycina. 1. Płat mózgowia ludzkiego, sekcjonowanego metodą Spielmeyera, z zaznaczonymi miejscami pobrania materiału do badań. LF -płat czołowy kory mózgu z zakrętem obręczy; CC- spoidło wielkie; Hip- hipokamp.

Materiał do badań utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie (Alpinus Chemia), poddano standardowej procedurze histologicznej i zatopiono w bloczki parafinowe. Mózgi ludzkie i psów krojono seryjnie mikrotomem obrotowym Leica RM2235 (Leica Biosystems) na 5 μm , 10 μm , 15 μm lub 20 μm skrawki (w zależności od zastosowanej metody barwienia), następnie losowo wybrano obszary mózgowia i analizowano cytoarchitektonicznie. Każdy obszar został zdefiniowany zgodnie z jego anatomiczną lokalizacją oraz morfometrycznie dzięki systemowi analizy obrazu komputerowego wyposażonego w oprogramowanie CellSense i mikroskop świetlny Olympus BX 53.

Zdjęcia mikroskopowe zostały cyfrowo zarejestrowane za pomocą wysokorozdzielczej kamery Olympus SC180 kompatybilnej z powyższym mikroskopem i automatycznym stolikiem. Preparaty histologiczne zrekonstruowano cyfrowo i przechowywano w postaci obrazów komputerowych

III.2 METODY

W celu określenia lokalizacji OLG wybranych obszarów OUN posłużono się metodą Cajala (Ramón y Cajal, 1889) w modyfikacji własnej (Maciej Golan, metoda nie publikowana). Do określenia dystrybucji żelaza w OLG posłużyła zmodyfikowana metoda histochemiczna wykrywania obecności jonów żelaza według LeVine (LeVine i Macklin 1990). W celu określenia położenia struktur mózgowia do analizy morfometrycznej oraz oceny rozmieszczenia OLG posłużyła standardowa metoda barwienia układu nerwowego metodą Nissla (Nissl, 1894). Barwienie metodą Klüvera–Barrery, które posłużyło do oceny demielinizacji i dysmielinizacji, wykonano gotowym zestawem (Bio–Optica), według procedury zalecanej przez producenta (Mora i wsp., 2007). Dla skrawków pochodzących od pacjentów wykonano barwienie immunohistochemiczne w celu wykazania obecności łańcucha ciężkiego ferrytyn (FTH) oraz barwienie immunohistochemiczne na obecność białka MBP. W skrawkach pochodzących od zwierząt wykonano barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał przeciwko specyficznemu MBP (LoPresti i wsp., 1995).

III.2.1 Impregnacja tkanki glejowej solami srebra

Barwienie wykonywano wedle klasycznej metody Cajala (Ramón y Cajal, 1889), w modyfikacji własnej (Maciej Golan, metoda nie publikowana). Materiał utrwalony w zbuforowanej formalinie pocięto na skrawki o grubości 3-5 mm, płukano 3-krotnie wodą destylowaną (2 X 30 min i 1 X 45 min) na urządzeniu wytrząsającym (15 obr./min).

Materiał osuszano i przenoszono do 2% roztworu dwuchromianu potasowego. Skrawki inkubowano z 48 godzin skrawki inkubowano na wytrząsarce (15obr./min), 3-krotnie płukano (3 X 5min) wodą destylowaną z łagodnym wytrząsaniem, a następnie skrawki trzymano przez 48 godzin w całkowitej ciemności w 2% roztworze azotanu srebra w wodzie destylowanej, z łagodnym wytrząsaniem (do 10 obr./min). Po zakończeniu inkubacji skrawki ponownie płukano (3 X 5 minut) w wodzie destylowanej i umieszczano w 50% roztworze etanolu przez 30 minut. W kolejnym etapie skrawki odwadniano w szeregu alkoholowym (70%, 90%, 2X 100%), prześwietlano w chloroformie (2X 30 minut), a następnie trzymano przez 1 godzinę w parafinie, w temperaturze 60°C. Skrawki pozostawiono w drugim naczyniu, z czystą parafiną, przez noc w 60°C. Po zakończeniu przepajania skrawki zatapiano, krojono na grubość 20 µm, odparafinowano i zamykano medium syntetycznym.

III.2.2 Histochemiczne wykrywanie obecności żelaza w oligodendrocytach według LeVine

Mikrotomowe skrawki grubości 15 µm odparafinowano w ksylenie, nawodniono w szeregu alkoholowym i suszono w temperaturze pokojowej. Na 30 minut skrawki przenoszono do mieszaniny zawierającej świeżo przygotowany 0,25 M HCl, 2% żelazicyjanek potasu $K_3[Fe(CN)_6]$ oraz 8% Triton X-100. Skrawki płukano roztworem PBS przez 30 minut i inkubowano w 60 mg 3,3'-dwuaminobenzydyny (DAB) (DAB; Sigma, St Louis, MO) w 300 ml 0,01 M Tris HCl (pH =7.6) z dodatkiem 600 µl 30% H_2O_2 . Inkubację prowadzono przez trzy godziny w całkowitej ciemności w temperaturze pokojowej, po czym skrawki płukano ponownie roztworem PBS przez 30 minut, odwadniano, prześwietlano w ksylenie i zatapiano w medium syntetycznym (Leica Biosystems).

III.2.3 Barwienie oligodendrocytów metodą Nissla

Skrawki grubości 10 µm odparafinowano w zmianach świeżego ksylenu, nawodniono w szeregu alkoholowym o malejącym stężeniu i barwiono (0,5 g/100 ml) roztworem fioletu krezyłu (Bio-Optica) w temperaturze 37°C. Następnie skrawki kontrastowano przy użyciu odbarwiacza: etanol – chloroform 3:1 przez 5 minut, następnie płukano dwukrotnie w 100% etanolu. Po zakończeniu barwienia preparaty odwadniano w szeregu alkoholowym, prześwietlano w ksylenie i zamykano medium syntetycznym (Leica Biosystems).

III.2.4 Morfologiczne kryteria pozwalające na odróżnienie komórek glejowych i neuronów

Zastosowanie metody Nissla pozwoliło na podstawie cech morfologicznych, określić rodzaje komórek w badanych obszarach mózgowia. W porównaniu do innych komórek neurogleju, OLG posiadają niewielkie okrągłe lub owalne jądro z gęstą, zbitą chromatyną oraz ciemną cytoplazmę. Zazwyczaj OLG układają się parami w grupach lub położone są w bliskim sąsiedztwie neuronów i naczyń krwionośnych (Baumann i Pham-Dinh, 2001). W przeciwieństwie do OLG, astrocyty posiadały okrągłe i blade wybarwione jądro z heterochromatyną zlokalizowaną głównie przy otoczce jądrowej oraz stosunkowo jasną cytoplazmę (Korbo 1999).

III.2.5 Barwienie metodą Klüvera-Barrery

Skrawki grubości 10 μm odparafinowano, nawadniano szeregu alkoholowym i płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4). Następnie umieszczono na noc w roztworze Luxol Fast Blue, w 56°C i płukano dwukrotnie w 95% roztworze etanolu. Czynność powtarzano do uzyskania właściwego stopnia zabarwienia. W kolejnym etapie skrawki barwiono metodą Nissla, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Po zakończeniu barwienia skrawki odwadniano w szeregu alkoholowym, prześwietlano w ksylenie i zamykano medium syntetycznym (Leica Biosystems). Uzyskane skrawki porównywano analizowano pod kątem poprawności mielinizacji i braku uszkodzeń demielinizacyjnych i dysmielinizacyjnych.

III.2.6 Barwienie immunohistochemiczne na obecność MBP (materiał ludzki)

Skrawki grubości 5 μm i odparafinowano w ksylenie, odwodniono szeregu alkoholowym i płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4). Skrawki przenoszono do buforu cytrynianowego o pH 6.0, płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4) i umieszczano na 5 minut w 3% roztworze H_2O_2 . Następnie skrawki przenoszono do 1% roztworu albuminy bydlęcej (BSA) w 0,01 M PBS (pH 7.4) z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100 i inkubowano z I-rzędowym przeciwciałem, w wilgotnej komorze przez noc, w temperaturze 4°C. Po zakończonej inkubacji skrawki 3-krotnie płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4) z 0,5 % Tritonem X-100 i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z II-rzędowym przeciwciałem, skoniugowanym z peroksydazą chrzanową. W kolejnym etapie skrawki 3-krotnie płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4), inkubowano przez 10 minut w 1% roztworze 3,3'-dwuaminobenzydyny (DAB) (Sigma, St Louis, USA) z 3% H_2O_2 w temperaturze pokojowej, płukano w 0,01 M PBS (pH 7.4) i podbarwiano jądra komórkowe przy użyciu hematoksyliny Mayera (Leica Biosystems). Po zakończeniu barwienia skrawki

odwadniano w szeregu alkoholowym, prześwietlano w ksylenie i zamykano medium syntetycznym (Leica Biosystems). Specyfikacje i stężenia przeciwciał umieszczono w tab.1.

III.2.7 Barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka MBP (materiał psi)

Skrawki mikrotomowe (5 μm) odparafinowano w ksylenie i nawodniono w szeregu alkoholowym, a następnie przenoszono do buforu cytrynianowego o pH 6.0. Wypłukane skrawki w 0,01 M PBS (pH 7.4) poddawano działaniu 1% roztworu albuminy bydlęcej (BSA) z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100 w 0,01 M PBS (w temperaturze pokojowej). W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z pierwotnym przeciwciałem rozpuszczonym w roztworze 1% BSA z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100 w 0.01 M PBS (1 doba w temperaturze 2-8⁰C). Następnie preparaty płukano w 0,01 M PBS i inkubowano w roztworze 1% BSA z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 w 0,01 M PBS zawierającym przeciwciała wtórne sprzężone z rodaminą (w temperaturze pokojowej). Specyfikacje i stężenia użytych przeciwciał przedstawia Tabela 1. Po trzykrotnym płukaniu w 0,01 M PBS skrawki odwadniano i zatapiano w medium syntetycznym, z dodatkiem DAPI (Vectorlabs). Uzyskane według powyższej procedury preparaty histologiczne obserwowano i dokumentowano przy pomocy mikroskopu Olympus Fluoview FV1000, z dedykowanym oprogramowaniem i zintegrowaną kamerą.

Tabela 1. Przeciwciała pierwotne i wtórne zastosowane w badaniach

Przeciwciało pierwotne (I-rzędowe)			Przeciwciało wtórne (II-rzędowe)		
Nazwa	Producent	Stężenie	Nazwa	Producent	Stężenie
monoklonalne mysie przeciwciało przeciw-MBP/Mouse monoclonal anti-MBP	Millipore MAB 382	1:50	Koźmi przeciwciało przeciw mysim przeciwciałom IgG sprzężone z rodaminą /Rhodamine Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch 115-025-003	1:200
			Koźmi przeciwciało, przeciwko mysim IgG, sprzężone z HRP/ Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen 31430	1:500

III.2.8 Określenie gęstości oligodendrocytów w wybranych obszarach OUN

W celu określenia gęstości OLG posłużono się analizą losowego, systematycznego pobierania próbek (West i wsp., 1991). Metoda ta polega na bezstronnym zliczaniu komórek o znanej objętości, w określonym obszarze i zależna jest od współczynnika kurczenia objętości tkanki (dla 4% formaliny o pH 7.4 wynosi 0,75) (Baak i wsp., 1989). Określone komórki mają takie samo prawdopodobieństwo wystąpienia, niezależnie od ich wielkości, kształtu lub orientacji tkankowej (West i wsp., 1991). Użyty do liczenia sprzęt wyposażony był w mikroskop świetlny Olympus BX53 z synchronizowaną aperturą numeryczną $NA = 1,4$, immersyjnym, olejowym obiektywem 60x, z automatycznym stolikiem Marzhauser i oprogramowaniem CellSense. W małym powiększeniu (2,5x) obrysowywano granice struktur wybarwionych metodą Nissla. Program komputerowy wyznaczył obszar analizy w ramce liczenia. Ramka liczenia została zdefiniowana wcześniej, dla każdego oznaczenia, zgodnie z zasadą, że co najmniej dwie liczone komórki mogły pasować do ramki. Podczas liczenia profili komórkowych na podstawie kryteriów morfologicznych klasyfikowano je do odpowiedniego typu komórek glejowych. Otrzymane dane pozwoliły na przeprowadzenie dokładnej analizy gęstości OLG przypadających na jednostkę pola testowego w badanych strukturach. Grubość każdego skrawka mierzono w trzech losowo wybranych miejscach. Liczono 190-200 komórek przypadających na daną strukturę. Zastosowana procedura zapewniła wybór systematycznej, losowej analizy skrawków, w których wszystkie odcinki wybranych obszarów miały równe prawdopodobieństwo występowania (West i wsp., 1991).

III.2.9 Obróbka danych i analiza statystyczna

Otrzymane dane morfometryczne poddano analizie statystycznej wykonując odpowiednie testy. W oparciu o dane źródłowe wykonano obliczenia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych ($\pm SD$) w arkuszu kalkulacyjnym Excel (Microsoft, Polska). Różnice w gęstości OLG pomiędzy poszczególnymi strukturami lub między zwierzętami oceniono wykonując test t-Studenta. Do oceny istotności różnic stopnia współwystępowania badanych OLG użyto testu dla istotności różnic wskaźników struktury. Wszystkie testy statystyczne wykonane zostały przy pomocy programu Statistica oraz arkusza kalkulacyjnego Excel (Microsoft, Polska). Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0.05$.

III.3 ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

III.3.1 Analizy wykonane dla genów kodujących białka ferrytyn

III.3.1.1 Kryteria doboru danych do analizy i użyte oprogramowanie

Sekwencje dobrze scharakteryzowanych ludzkich FTL (NP_002023.2) i FTH (NP_000137.2) zostały użyte do wyszukania pozostałych FT kręgowców:

- w bazie danych NCBI, nie zawierającej sekwencji repetytywnych (ang. non – redundantdatabase) (Sayers i wsp., 2020),
- w bazie danych znaczników ekspresowanych sekwencji EST (ang. Expressed sequence tags),
- jako sekwencje transkryptomów, uzyskane metodą shotgun (ang. Transcriptome Shotgun Assembly - TSA) sekwencji genomowych (ang. whole-genome shotgun contigs WGS)
- przy użyciu algorytmu BLAST (Basic local alignment search tool). BLAST to algorytm i program do porównywania informacji o pierwotnych sekwencjach biologicznych, takich jak sekwencje aminokwasowe białek lub nukleotydy sekwencji DNA i/lub RNA. Wyszukiwanie BLAST umożliwia porównanie danej sekwencji białkowej lub nukleotydowej z biblioteką lub bazą danych sekwencji i identyfikację sekwencji w bazie danych, które przypominają sekwencję zadaną, powyżej zdefiniowanego progu prawdopodobieństwa (Altschul i Lipman, 1990). Dodatkowo przeszukano bazy danych Ensembl i Uniprot i wykorzystano je jako źródło sekwencji FT do analizy. Otwarte ramki odczytu (ang – open reading frame ORF), skrócone lub uszkodzone ORF (nieprawidłowo złożone) zostały zweryfikowane bezpośrednio z regionów genomowych. Skorygowane sekwencje białek zostały zweryfikowane przez algorytm BLAST.

Wszystkie białka zawierające domenę Pfam (Protein Families) ferrytyny (PF00210) zostały wyekstrahowane i poddane dalszej ocenie (El-Gebali i wsp., 2019). Do analizy filogenetycznej wybrano 18 najlepiej zbadanych modelowych strunowców na podstawie ich sekwencji genomowej:

- ✓ ssaki (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*),
- ✓ ptaki (*Gallus gallus*, *Taeniopygia guttata*),
- ✓ gad (*Crocodylus porosus*),
- ✓ płazy (*Xenopus tropicalis*, *Rhinatrema bivittatum*),
- ✓ ryby kostnoszkieletowe (*Danio rerio*),
- ✓ ryba dwudyszna (*Lepidosiren paradoxa*),

- ✓ ryba mięśniopłetwa (*Latimeria chalumnae*),
- ✓ ryby chrzęstnoszkieletowe (*Callorhynchus milii*, *Squalus acanthias*),
- ✓ bezzuchwowiec (*Eptatretus burgeri*, *Petromyzon marinus*), lancetnik (*Branchiostoma lanceolatum*)
- ✓ osłonice (*Ciona savignyi*, *Oikopleura dioica*).

Porównania wykonano za pomocą oprogramowania Mafft (Katoh i Standley, 2013), uzgodniono za pomocą trimAl (Capella-Gutiérrez i wsp., 2009). Drzewa filogenetyczne wykreślono za pomocą Phylml (Guindon i wsp., 2010), IqTree (Nguyen i wsp., 2015) i MrBayes (Ronquist i wsp., 2012). Wybór modelu uzyskano z oprogramowania IqTree. Drzewo gatunkowe zostało zbudowane na podstawie wcześniejszych danych i wykorzystane do rekonyliacji w programie Notung 2.9. Rekonyliację zweryfikowano programem Seaview 5.04. Drzewa filogenetyczne wizualizowano za pomocą oprogramowania iTOL (Letunic i Bork, 2016). Jako grupę bazową do analiz użyto sekwencji genów FT pochodzących z osłonic (*Tunicata*).

W celu analizy potencjalnych zdolności ferroksoydacyjnych izoform FT, występujących u różnych grup zwierząt zebrano sekwencje białkowe poszczególnych izoform maksymalnie od 20 zwierząt z każdej grupy taksonomicznej. Sekwencje porównywano przy użyciu oprogramowania MAFFT v7.409, stosując strategię automatyzacji (Katoh i Standley, 2013), a fragmenty obejmujące miejsce katalityczne ferroksoydacji wyekstrahowano i ujednolicono manualnie. Logotypy poszczególnych białek utworzono w programie Weblogo (Crooks i wsp., 2004).

III.3.2 Analizy dla genu *MBP*

Podjęto próbę alternatywnego podejścia do analizy białka MBP, w oparciu o dostępne sekwencje w bazie GeneBank ponieważ dla genu *MBP* nie ma żadnych danych, wskazujących na jego pochodzenie. Do przeszukania algorytmem BLAST proteomów przedstawicieli kręgowców w bazie GeneBank (niezawierającej sekwencji repetytywnych) użyto sekwencji ludzkiego białka MBP (pfam PF01669; chromosom 18q23 Gene ID: 4155, locus LOC107987261, Acc nr NC_000018.10). Do dalszej analizy wybrano proteomy wybranych przedstawicieli gatunków kręgowców:

- ✓ człowiek (*Homo sapiens*)
- ✓ pies (*Canis familiaris*),
- ✓ mysz (*Mus musculus*)
- ✓ koala (*Phascolarctos cinereus*)

- ✓ monodelf szary (*Monodelphis domestica*)
- ✓ dziobak (*Ornithorhynchus anatinus*)
- ✓ kolczatka australijska (*Tachyglossus aculeatus*)
- ✓ kura (*Gallus gallus*)
- ✓ aligator chiński (*Alligator sinensis*)
- ✓ krokodyl różańcowy (*Crocodylus porosus*)
- ✓ żółwiak chiński (*Pelodiscus sinensis*)
- ✓ żółwie (*Gopherus evgoodei*, *Chelonia mydas*)
- ✓ płazy (*Rhinatrema bivittatum*)
- ✓ strumienica- (*Typhlonectes compressicauda*)
- ✓ prapłaziec (*Lepidosiren paradoxa*)
- ✓ prapłetwiec brunatny (*Protopterus annectes*) (* - dane tylko z RNA-seq)
- ✓ latimeria (*Latimeria chalumnae*)
- ✓ niszczuka plamista (*Lepisosteus oculatus*)
- ✓ rekiny (*Rhincodon typus*, *Scyliorhinus torazame*)
- ✓ lancetnik jako sekwencja bazowa.

Zebrane sekwencje porównano z użyciem algorytmów ClustalW i MAFFT (Thompson i wsp., 1994; Katoh i wsp., 2019) i wykonano analizę filogenetyczną. Drzewo filogenetyczne wizualizowano z użyciem algorytmu I-Tol.

III.3.3 Analizy dla genu *MOG*

MOG należy do rodziny butyrofilin (BTN), które nie mają wyraźnie konserwowanych homologów pomiędzy organizmami, tylko tworzą subpopulacje podobnych białek. Cechą wspólną BTN jest domena immunoglobuliny V-set, wykazująca dużą zmienność, dlatego podjęto się alternatywnego podejścia do wyjaśnienia pochodzenia *MOG*. Używając sekwencji domeny V-set (pfam PF07686) ludzkiego białka *MOG* (chromosom 6, 6p22.1, Gene ID: 4340 (gene_synonym BTN6; BTNL11; MOGIG2; NRCLP7), locus NC_000006, Acc nr NP_001008230, zakres 11-144 aminokwasów) przeszukano bazę danych białek GenBank algorytmem BLAST wybranych przedstawicieli gatunków zwierząt kręgowych:

- ✓ człowiek (*Homo sapiens*)
- ✓ mysz (*Mus musculus*)
- ✓ pies (*Canis familiaris*)
- ✓ koza (*Capra hircus*)
- ✓ pancernik (*Dasyurus novemcinctus*)

- ✓ diabeł tasmański (*Sarcophilus harrisii*)
- ✓ koala (*Phascolarctos cinereus*)
- ✓ monodelf szary (*Monodelphis domestica*)
- ✓ dziobak (*Ornithorhynchus anatinus*),
- ✓ kolczatka australijska (*Tachyglossus aculeatus*)
- ✓ kura (*Gallus gallus*)
- ✓ aligator chiński (*Alligator sinensis*)
- ✓ żółwiak chiński (*Pelodiscus sinensis*)
- ✓ żółwie (*Gopherus evgoodei*, *Chelonia mydas*),
- ✓ płazy (*Rhinatrema bivittatum*, *Geotrypetes seraphini*)
- ✓ strumienica (*Typhlonectes compressicauda*)
- ✓ prapłaziec (*Lepidosiren paradoxa** - dane tylko z RNA-seq),
- ✓ latimeria (*Latimeria chalumnae*)
- ✓ niszczuka plamista (*Lepisosteus oculatus*),
- ✓ rekiny (*Rhincodon typus*, *Scyliorhinus torazame*)
- ✓ lancetnik jako sekwencja bazowa.

Analizy filogenetyczne dla białka MOG wykonano analogicznie jak dla MBP.

III.3.4 Analiza promotora MOG

U ludzi MOG występuje specyficznie w OLG. W celu wyjaśnienia czy promotor genu MOG determinuje selektywną ekspresję w OUN zbadano *in silico* jego sekwencję. Wykonano analizę czynników transkrypcyjnych, które potencjalnie wiążą się do promotora ludzkiego MOG (długości 3868 pz) i mogą być odpowiedzialne za jego aktywację. Użyto bazy danych TF2DNA (Pujato i wsp., 2014). Dodatkowo wykonano analizę lokalizacji tkankowej czynników transkrypcyjnych wg proteinatlas.

IV. WYNIKI

IV.1 Obserwacje lokalizacji OLG w obszarach słabo i mocno zmielinizowanych mózgowia u człowieka i psa na poziomie mikroskopu świetlnego.

IV.1.1 Barwienie metodą Klüvera-Barrery

W celu określenia poprawnej mielinizacji wybranych obszarów OUN u człowieka i psa, zastosowano barwienie metodą Klüvera-Barrery. Metoda ta pozwala wybarwić osłonki mielinowe oraz komórki glejowe, a podczas barwienia używa się barwnik Luxol Fast Blue oraz fiolet krezyłu, które wybarwiają odpowiednio mielinę oraz substancję Nissla.

Wszystkie analizowane obszary u ludzi oraz psa, ocenione zostały w celu wykluczenia obszarów, w których wystąpiłyby uszkodzenia mieliny. Zastosowanie fioletu krezyłu pozwoliło wykazać we wszystkich wybarwionych skrawkach mózgowia u człowieka i psa, fioletowo wybarwioną substancję Nissla, zlokalizowaną w perykarionach neuronów. Zastosowanie barwnika LuxolFast Blue umożliwiło obserwację osłonek mielinowych, które wybarwiały się na niebiesko lub w odcieniu niebiesko-zielonym. We wszystkich przeanalizowanych skrawkach w badanych obszarach mózgowia u człowieka i psa wykazano prawidłowe wybarwienie, zmielinizowanych obszarów. Nie zaobserwowano różnic morfologicznych pomiędzy kobietami i mężczyznami oraz pomiędzy samicami i samcami u psów (Ryc 2 - 4).

IV.1.2 Barwienie metodą Nissla

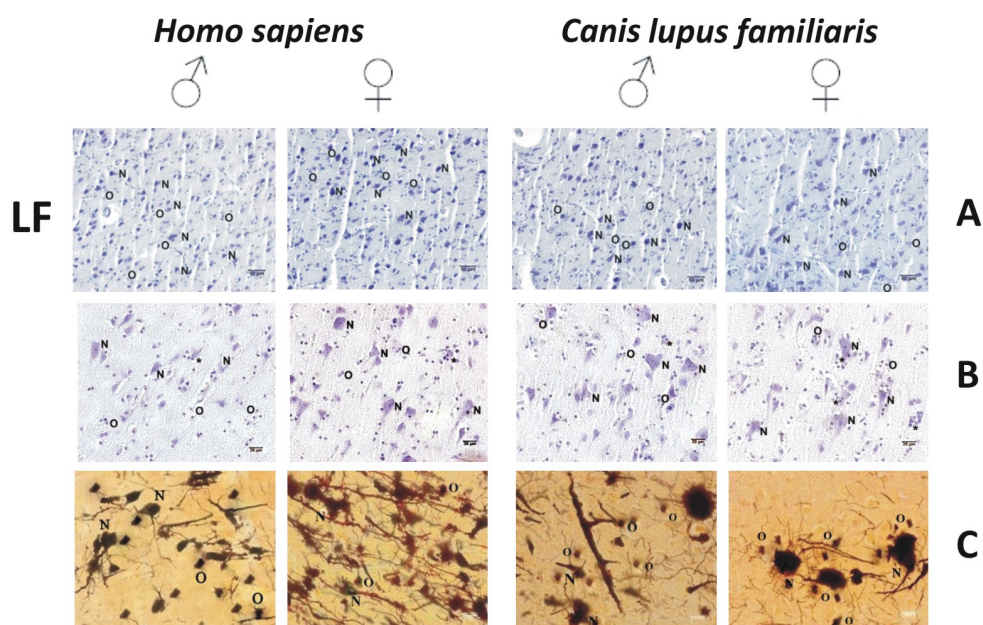
Technika barwienia Nissla jest powszechnie stosowaną metodą określającą cytoarchitekturę mózgowia, która w prosty sposób pozwala uwidocznić na preparatach różnice pomiędzy neuronami oraz neuroglejem. We wszystkich badanych preparatach u człowieka i psa, wykazano odpowiednią dla danego obszaru budowę oraz uwidoczniło różnice pomiędzy komórkami nerwowymi i glejowymi. W preparatach nie obserwowano różnic morfologicznych pomiędzy osobnikami u ludzi oraz psów.

W preparatach ludzkich w obszarze LF u kobiet i mężczyzn widoczna była zachowana sześciowarstwowa jej struktura. Poszczególne warstwy różniły się głównie zawartością i rodzajem neuronów. Ponadto obserwowano OLG towarzyszące astrocytom oraz naczyniom krwionośnym. W obszarze LF w preparatach z materiału psiego podobnie jak w preparatach z materiału ludzkiego widoczne były zachowane warstwy I – VI. U psa, obszarem z największym zagęszczeniem neuronów były warstwy III – IV (Ryc. 2)

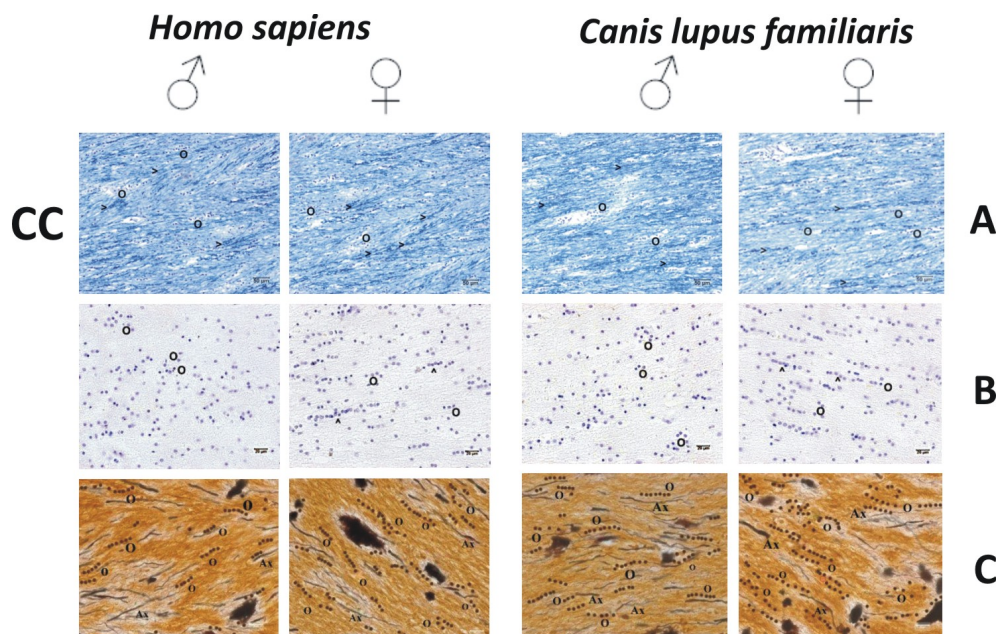
W skrawkach wybarwionych metodą Nissla w obszarze Hip/u ludzi, widoczne były cztery obszary, określane w piśmiennictwie jako pola CA1–CA4. W preparatach zachowana była cytoarchitektonika tego obszaru, a odpowiednie pola i warstwy związane były z lokalizacją neuronów, ich kształtem oraz rozmieszczeniem (Ryc. 4)

Obraz histologiczny Hip w preparatach pochodzących od samic i samców psów nie różnił się. Cytoarchitektonika tego obszaru była widoczna na preparatach, a odpowiednie pola i warstwy podobnie jak u ludzi związane były z lokalizacją neuronów, ich kształtem i rozmieszczeniem. OLG najczęściej występowały pojedynczo, lub w parach, zazwyczaj towarzyszyły neuronom lub naczyniom krwionośnym (Ryc. 4)

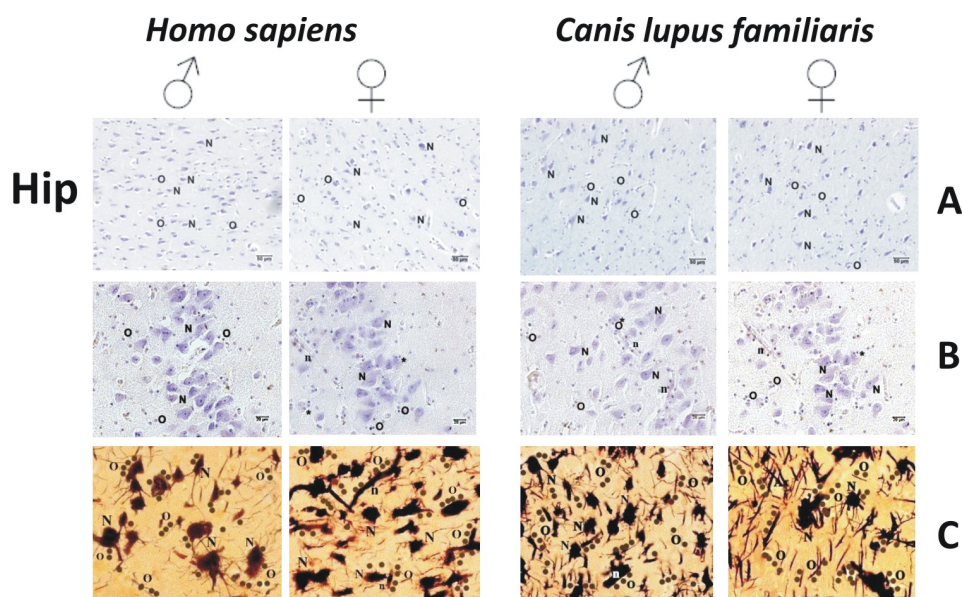
W obszarze CC w preparatach z mózgów kobiet i mężczyzn oraz u samic i samców psa, OLG układały się w charakterystyczne rzędy po kilka lub kilkanaście obok siebie i towarzyszyły występującym w tym obszarze licznym włóknom nerwowym. W niektórych miejscach w preparacie widoczne były naczynia krwionośne. Nie obserwowano różnic morfologicznych pomiędzy osobnikami męskimi i żeńskimi u ludzi oraz psów (Ryc. 3).



Rycina. 2 Oligodendrocyty z obszaru płata czołowego (LF) człowieka i psa. A. Barwienie metodą Klüvera-Barrery. B. Barwienie fioletem krezyłu. C. Impregnacja solami srebra metodą Cajala. Znacznik wielkości: 50 um dla barwienia metodą Klüvera-Barrery i 20 um dla pozostałych metod. Na zdjęciach widoczne charakterystyczne ułożenie oligodendrocytów. Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; N-neuron; * - oligodendrocyty układające się wokół największych neuronów. Opis w tekście.



Rycina 3 Oligodendrocyty z obszaru ciała modzelowatego (CC) człowieka i psa. A Barwienie metodą Klüvera-Barrery. B. Barwienie fioletem krezyłu. C. Impregnacja solami srebra metodą Cajala. metodą Cajala. Znacznik wielkości: 50 um dla barwienia metodą Klüvera-Barrery i 20 um dla pozostałych metod. Na zdjęciach widoczne charakterystyczne ułożenie dla oligodendrocytów. Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; N-neuron; > włókna nerwowe silnie zmielinizowane. Opis w tekście



Rycina 4 Oligodendrocyty z pola CA1/CA2 Hipokampa (Hip) człowieka i psa. A. Barwienie metodą Klüvera-Barrery. B. Barwienie fioletem krezyłu. C. Impregnacja solami srebra metodą Cajala. Znacznik wielkości: 50 um dla barwienia metodą Klüvera-Barrery i 20 um dla pozostałych metod. Na zdjęciach widoczne charakterystyczne ułożenie dla oligodendrocytów. Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; N-neuron; n-naczynie krwionośne; * - oligodendrocyty układające się wokół największych neuronów. Opis w tekście.

IV.1.3 Impregnacja solami srebra

Zastosowana metoda impregnacji solami srebra skrawków z obszarów: LF, Hip oraz CC u ludzi i psów umożliwiła obserwację rozmieszczenia i lokalizację OLG względem charakterystycznych struktur dla wybranych obszarów mózgowia OUN. W tej metodzie barwienia w preparatach OLG były ciemno-brązowe, posiadały skąpą ilość krótkich wypustek odchodzących od zazwyczaj kulistego ciała komórkowego. We wszystkich badanych preparatach u ludzi i psów rozmieszczenie OLG było podobne. W preparatach pomiędzy materiałem ludzkim i psim nie zaobserwowano różnic w morfologii oraz w lokalizacji OLG. W obszarze LF w preparatach impregnowanych solami srebra u osobników żeńskich i męskich u ludzi oraz psów, obserwowano różnorodność komórkową pomiędzy poszczególnymi jej warstwami. Ta różnorodność i zmienność komórkowa jest jednym z głównych czynników, która określa warstwowość kory. W tym obszarze mózgowia w preparatach widoczne były głównie neurony, naczynia krwionośne, pojedyncze włókna nerwowe oraz towarzyszące tym strukturom komórki neurogleju. OLG rozmieszczone były nierównomiernie, głównie w głębszych warstwach kory, położonych blisko substancji białej. We wszystkich preparatach zarówno u ludzi jak i u psów w powierzchniowych warstwach kory OLG występowały

pojedynczo. Taka dystrybucja OLG najprawdopodobniej odzwierciedla ich bliskość z długimi zmielinizowanymi włóknami nerwowymi lokalizującymi się zwłaszcza w warstwie V i VI. Obecność OLG we wszystkich warstwach LF sugeruje, że nie są one tylko związane neuronami warstw głębokich, ale również warstw powierzchniowych. W warstwach położonych w pobliżu istoty białej OLG komunikują się z większą liczbą włókien nerwowych. Obserwacje skrawków LF u ludzi i psów potwierdziły, że OLG występowały najczęściej w głębokich warstwach kory, ponieważ ten obszar przylega bezpośrednio do istoty białej i reprezentuje przejście pomiędzy istotą szarą i białą (Ryc.2).

W impregnowanych skrawkach Hip u ludzi oraz psów OLG były nierównomiernie rozłożone i lokalizowały się głównie w miejscach zawierających naczynia krwionośne oraz włókna zmielinizowane. Obraz histologiczny Hip w preparatach ludzkich i u psów nie różnił się od siebie. OLG obecne były przede wszystkim w warstwie, w której występują włókna śródwęchowe aferentne tj. w warstwie SLM oraz w warstwie SR, głównie pola CA2. W polu CA1 OLG spotykane były sporadycznie. Czasami w preparatach widoczne były pojedyncze komórki położone przy neuronach, głównie w warstwie SO pola CA3. Najliczniej OLG reprezentowane były w warstwie SLM, co sugeruje występowanie dużej ilości włókien nerwowych zmielinizowanych. Obserwacje skrawków histologicznych w badanym obszarze OUN u człowieka i psa wykazały, że OLG najczęściej lokalizowały się przy, lub w pobliżu naczyń krwionośnych, przy neuronach oraz innych typach komórek glejowych (Ryc. 4)

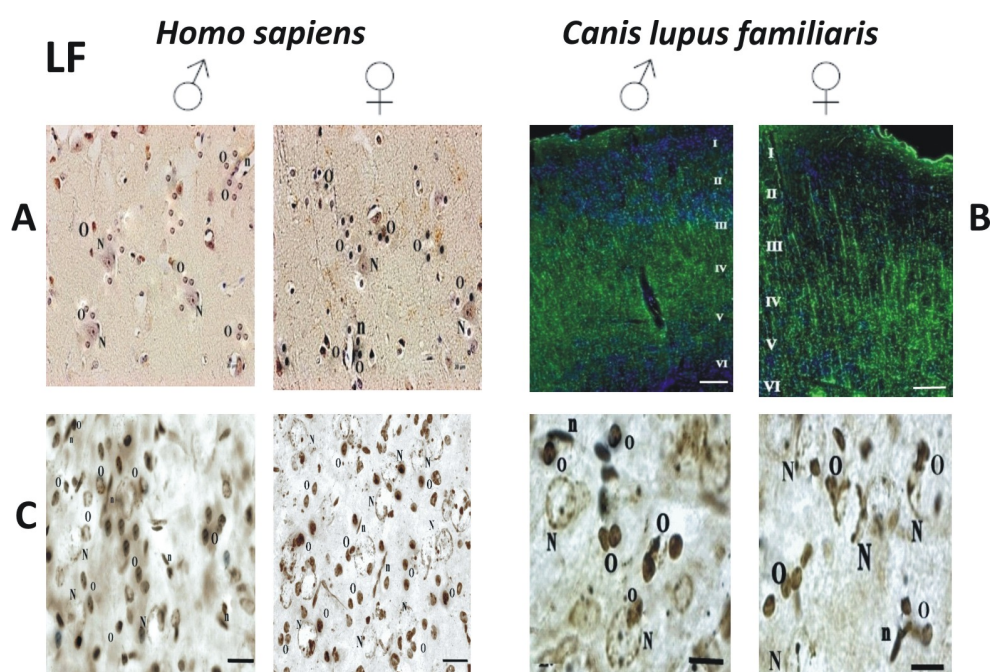
W obszarze mocno zmielinizowanym tj. w obszarze CC u ludzi oraz psów, OLG wykazywały podobny wzór lokalizacji. Układały się szeregowo, równoległe do siebie lub tworzyły pary. Pomiedzy komórkami glejowymi widoczne były liczne włókna nerwowe najczęściej ułożone w pęczki, w bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnych, wypustki OLG przylegały do włókien nerwowych. Podobnie jak OLG, włókna nerwowe wybarwione były w kolorze ciemnobrązowym (Ryc. 3)

IV.1.4 Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza w oligodendrocytach

W skrawkach wybarwionych histochemicznie na obecność żelaza zarówno u ludzi jak i psów, brązowy produkt reakcji widoczny był w cytoplazmie OLG oraz ich wypustkach. Odczyn reakcji obecny był również poza obrębem ciała OLG, co najprawdopodobniej odpowiadało osłonkom mielinowym. OLG posiadały małe, okrągłe ciało, z ciemnobrązową cytoplazmą oraz skąpą liczbą wypustek. We wszystkich

miejscach produkt reakcji żelaza był brązowy, ponieważ reakcja została wzmocniona przez zastosowanie DAB. Wzór barwienia najprawdopodobniej ma związek z naczyniami krwionośnymi i lokalizującymi się przy nich OLG. We wszystkich badanych skrawkach u ludzi i psów rozmieszczenie OLG było podobne oraz nie obserwowano różnic w lokalizacji tych komórek, w intensywności odczynu histochemicznego obecnego w komórkach i wypustkach OLG oraz osłonkach mielinowych otaczających włókna nerwowe, u kobiet i mężczyzn oraz u samic i samców psa.

W obszarach słabo zmielinizowanych tj. w obszarze LF oraz Hip, żelazo-pozytywne OLG wykazywały podobny wzór rozmieszczenia jak na skrawkach impregnowanych solami srebra. Brązowy produkt reakcji histochemicznej obecny był w OLG, natomiast słaby odczyn na obecność żelaza obserwowano pomiędzy OLG. W obszarach z przewagą substancji szarej, żelazo-pozytywne OLG układały się pojedynczo, tworzyły pary, najczęściej lokalizowały się w sąsiedztwie naczyń krwionośnych lub towarzyszyły neuronom. Podobnie jak w skrawkach impregnowanych solami srebra w obszarze kory, OLG głównie występowały w dolnych jej warstwach. W pozostałych warstwach kory zazwyczaj obserwowano pojedyncze OLG, a produkt reakcji widoczny był również w mielinie, która otaczała skąpą ilość włókien nerwowych. Brązowy produkt reakcji widoczny był we wszystkich OLG oraz ich wypustkach, a jego intensywność w badanych obszarach u ludzi i psów była podobna (Ryc. 5)

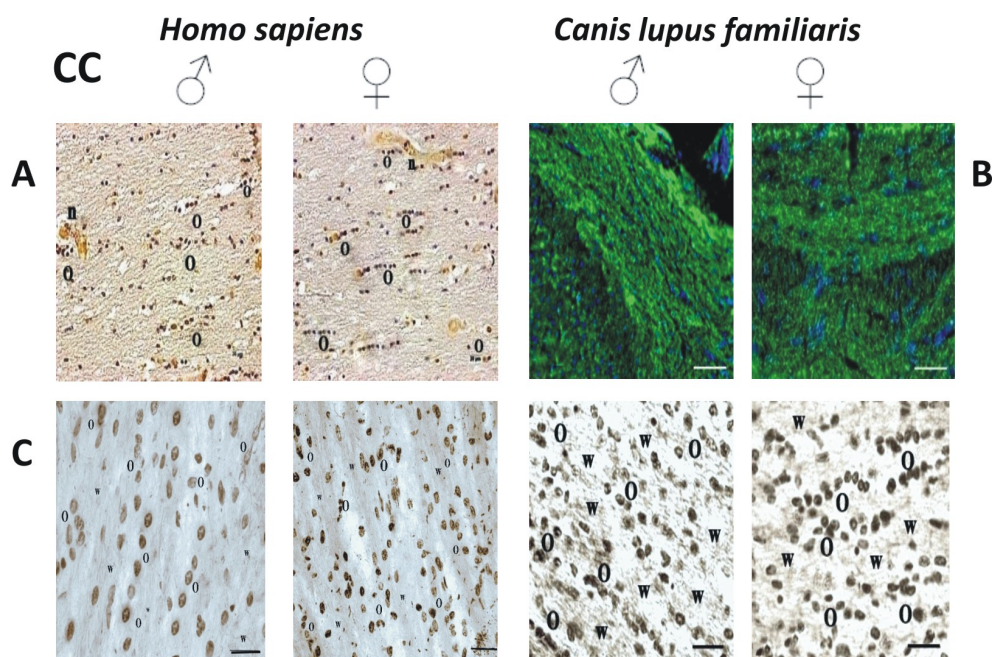


Rycina 5. .Oligodendrocyty z obszaru płata czołowego (LF) człowieka i psa.

A. Barwienie immunohistochemiczne na obecność łańcucha ciężkiego ferrytyn (FTH) u człowieka. B. Barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka MBP u psa. Kolor niebieski w mikroskopie identyfikuje jądra komórkowe przez barwienie DAPI. C. Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza w oligodendrocytach. Znacznik wielkości: 20 um. Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; N-neuron; n- naczynie krwionośne; opis w tekście.

W obszarze Hip u ludzi i psów w preparatach, żelazo-pozytywne OLG podobnie jak w metodzie srebrzej były nierównomiernie rozłożone i lokalizowały się głównie w miejscach zawierających włókna zmielinizowane oraz naczynia krwionośne. Najliczniej reprezentowane były warstwie SLM i SR pola CA2 i CA3. W polu CA1 najczęściej OLG występowały pojedynczo głównie w warstwie SO lub SR. OLG w miały owalne lub okrągłe ciało komórkowe, czasem widoczne były ich krótkie wypustki z widocznym produktem reakcji histochemicznej. Podobnie jak w LF, OLG we wszystkich badanych preparatach u ludzi i psów najczęściej ułożone były pojedynczo, czasami w parach, przy naczyniach krwionośnych lub przy neuronach. Intensywny odczyn widoczny był w ciele OLG oraz ich wypustkach, słaby we włóknach nerwowych obecnych w Hip (Ryc. 7).

W badanych skrawkach u ludzi i psów w obszarze CC, reakcja histochemiczna wykazała obecność licznych brązowo wybarwionych OLG. Produkt reakcji wykazywały ułożone szeregowo, w rzędach OLG, pomiędzy zmielinizowanymi włóknami nerwowymi oraz przy naczyniach krwionośnych. OLG były intensywnie wybarwione zgodnie z założeniem, że stężenie żelaza w substancji białej było wyższe niż w miejscach, gdzie dominowała substancja szara. Na preparatach OLG wykazywały typową dla nich morfologię. Ciała OLG miały kształt kulisty, z ciemno wybarwioną cytoplazmą, od którego odchodziły krótkie porzgałęziane wypustki. Rozproszone barwienie tła w postaci małych pierścieni pochodziło najprawdopodobniej od wypustek OLG. Odczyn widoczny był we włóknach nerwowych leżących pomiędzy szeregami OLG. Intensywność odczynu histochemicznego na obecność żelaza w obszarze spoidła wielkiego była podobna u ludzi i psów (Ryc. 6)



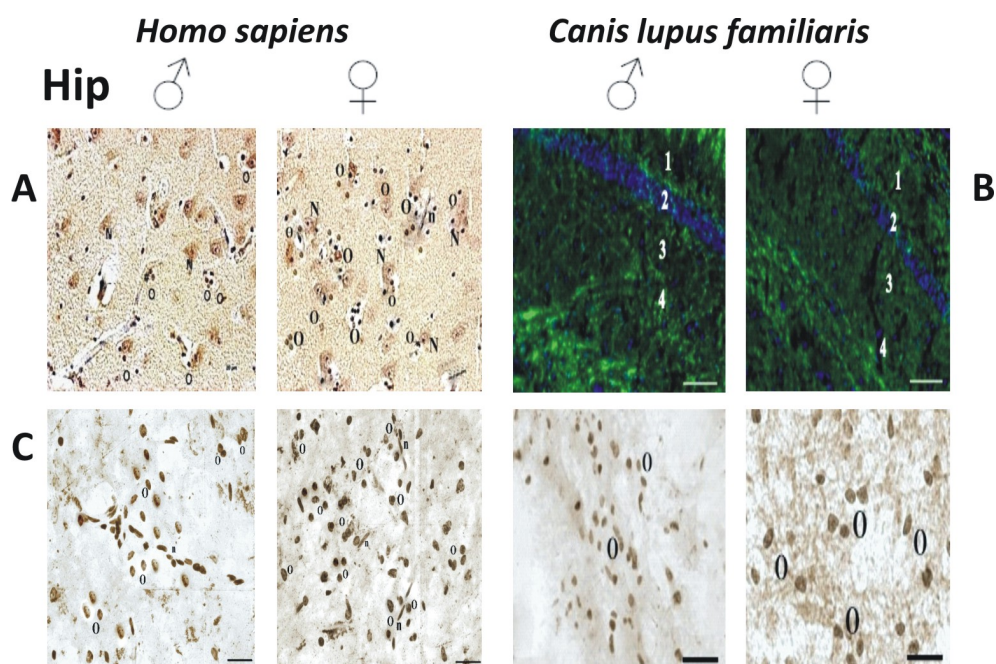
Rycina 6. Oligodendrocyty z obszaru ciała modzelowatego (CC) człowieka i psa. A. Barwienie immunohistochemiczne na obecność łańcucha ciężkiego ferrytyn (FTH) u człowieka. B. Barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka MBP u psa. Kolor niebieski w mikroskopie identyfikuje jądra komórkowe przez barwienie DAPI. C. Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza w oligodendrocytach. Znacznik wielkości: 20 um Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; n- naczynie krwionośne, w– włókna nerwowe– opis w tekście

IV.1.5 Barwienie na obecność białka MBP

Aby określić dystrybucję komórkową ekspresji MBP w preparatach u psów i ludzi w obszarach OUN zastosowano barwienie z użyciem przeciwciał przeciw-MBP i wizualizowano przy pomocy wtórnego przeciwciała sprzężonego z rodaminą dla materiału pochodzącego od psów i przeciwciała sprzężonego z HRP, wizualizowanego przy użyciu DAB, dla materiału ludzkiego. W preparatach produkt reakcji widoczny był głównie w OLG oraz włóknach nerwowych zmielinizowanych we wszystkich badanych obszarach mózgowia. Wyznakowane fluorescencyjnie OLG, posiadały intensywnie zielono zabarwione, okrągłe ciało komórkowe, czasami widoczne były delikatne, krótkie i nieliczne wypustki. We wszystkich analizowanych przekrojach mózgowia zarówno u kobiet i mężczyzn oraz u samic i samców psa, wyznakowane MBP-pozytywne OLG oraz włókna nerwowe zmielinizowane wykazywały podobne intensywne wybarwienie. Immunoreaktywność neuropilu badanych obszarów mózgowia u ludzi i psów zależna była od liczby MBP-pozytywnych OLG. W obszarach LF i Hip u ludzi i psów wyznakowane OLG wykazywały podobny wzór lokalizacji, a ich intensywność i rozkład

pokrywał się ze wzorem lokalizacji obserwowanej w metodzie srebrowej, histochemicznej, barwieniu metodą Nissla oraz Klüvera-Barrery (Ryc. 1 i 3)

W obszarze CC u ludzi i psów, produkt reakcji widoczny był również we włóknach nerwowych posiadających osłonkę mielinową. Podobnie jak w obszarach o skąpej zawartości włókien nerwowych zmielinizowanych intensywność i rozkład fluorescencyjnie MBP-pozytywnych OLG pokrywał się ze wzorem lokalizacji obserwowanej w metodzie srebrowej, histochemicznej i przy zastosowaniu metody Nissla oraz Klüvera-Barrery (Ryc. 2)



Rycina 7. Oligodendrocyty z pola CA1/CA3 Hipokampa (Hip) człowieka i psa.

A. Barwienie immunohistochemiczne na obecność łańcucha ciężkiego ferrytyn (FTH) u człowieka. B. Barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka MBP u psa. Kolor niebieski w mikroskopie identyfikuje jądra komórkowe przez barwienie DAPI. C. Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza w oligodendrocytach. Znacznik wielkości: 20 um. Użyte oznaczenia: O – oligodendrocyty; N-neuron; n- naczynie krwionośne; 1- SO, 2- SP, 3- SR, 4- SLM; opis w tekście.

IV.1.6 Określenie liczby oligodendrocytów w wybranych obszarach OUN

Zastosowana analiza morfometryczna pozwoliła określić liczbę OLG w badanych obszarach mózgowia kobiet i mężczyzn oraz samic i samców u psa. W tab.2 przedstawiono dane, średnie z 10 pomiarów gęstości OLG z wybranych obszarów mózgowia u ludzi i psów. Wynik podano jako liczbę OLG na mm^3 . Analiza statystyczna dla żadnego z badanych obszarów OUN u człowieka nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi obszarami mózgowia oraz pomiędzy mężczyznami, a kobietami przy założeniu istotności $p < 0.05$ (Tab 2). Jedynym obszarem u psów, dla którego stwierdzono

statystyczną istotność różnic, pomiędzy samcami i samicami, był LF (istotność na poziomie $p=0,05$) (Tab. 3).

Tabela 2. Gęstość OLG w wybranych strukturach mózgu u mężczyzn i kobiet. Wynik podano jako liczbę OLG na mm^3 .

Obszar mózgu	Kora		Hipokamp		Spoidło	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Średnia	117729,9	99035,9	125333,3	126102,3	424503,2	427302,2
SD	15123,1	6913,4	30313,19	23422,2	70202,1	65023,1

Tabela 3. Gęstość OLG w wybranych strukturach mózgu u samców i samic psa. Wynik podano jako liczbę OLG na mm^3 .

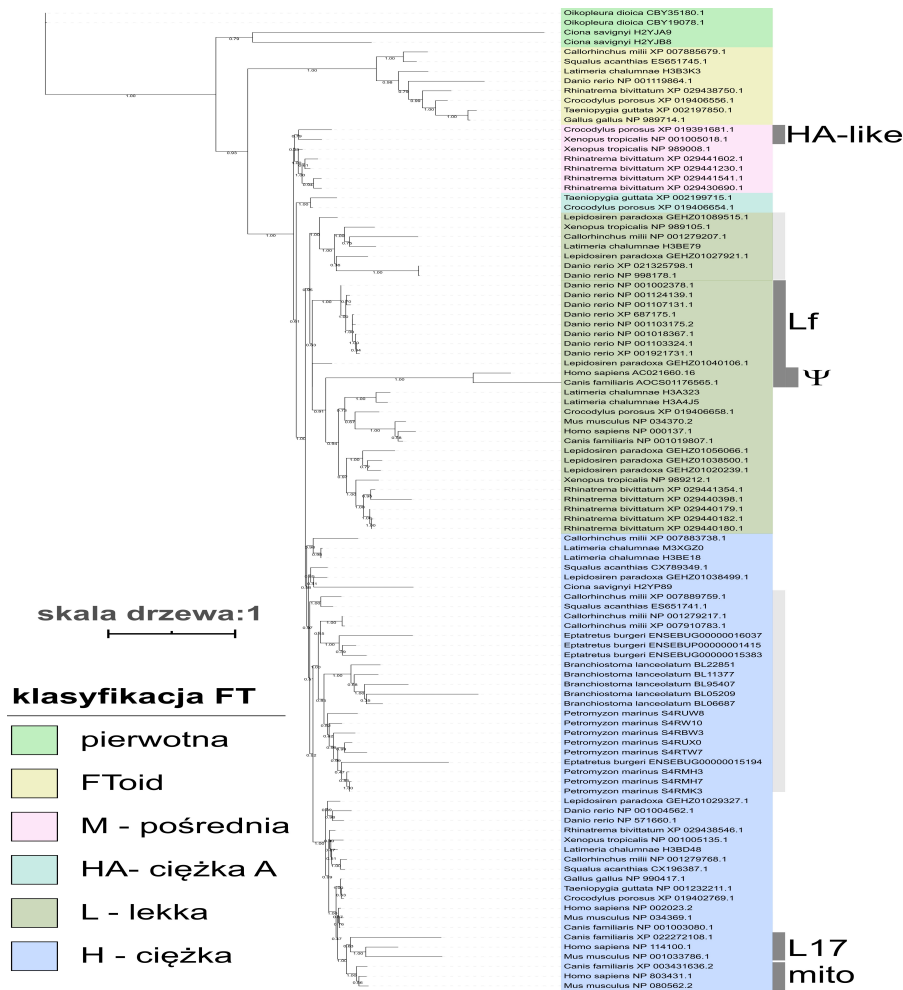
Obszar mózgu	Kora		Hipokamp		Spoidło	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Średnia	129567,3	127576,3	133112,9	132789,2	550078,5	549981,7
SD	16004,7	26787	29878,2	314002,2	73112,2	78991,2

IV.2 Analizy filogenetyczne

W ramach wykonanych analiz wykorzystano analizy filogenetyczne, analizy sekwencji promotorów i modelowanie funkcjonalne analizowanych kluczowych białek OLG.

IV.2.1 Analiza filogenetyczna ferrytyn

Analiza filogenetyczna 101 sekwencji FT z 18 modelowych kręgowców wykazała, że rodzinę FT tworzy co najmniej sześć podrodzin, nierównomiernie rozmieszczonych pomiędzy taksonami. Te podrodziny odpowiadają wcześniej opisanym w literaturze typom FT. W wyniku przeprowadzonych analiz wyróżniono następujące podrodziny FT: FTA (pierwotna), FToid (ferrytoid), FT-HA (łańcuch ciężki A), FTM (łańcuch średni), FTL (łańcuch lekki) i FTH (łańcuch ciężki). Istnieje ograniczona liczba danych opublikowanych dotyczących taksonów zwierzęcych, które nie są odtwarzane innymi metodami rekonstrukcji drzew. W związku z tym wspólne pochodzenie podrodzin FTL i FTH wydaje się niepewne, ponieważ ich pozycja na drzewie różni się w zależności od zastosowanej metody. Podrodzina FToid tworzy dobrze wyróżniający się kład we wszystkich testowanych układach badawczych (Ryc. 8).

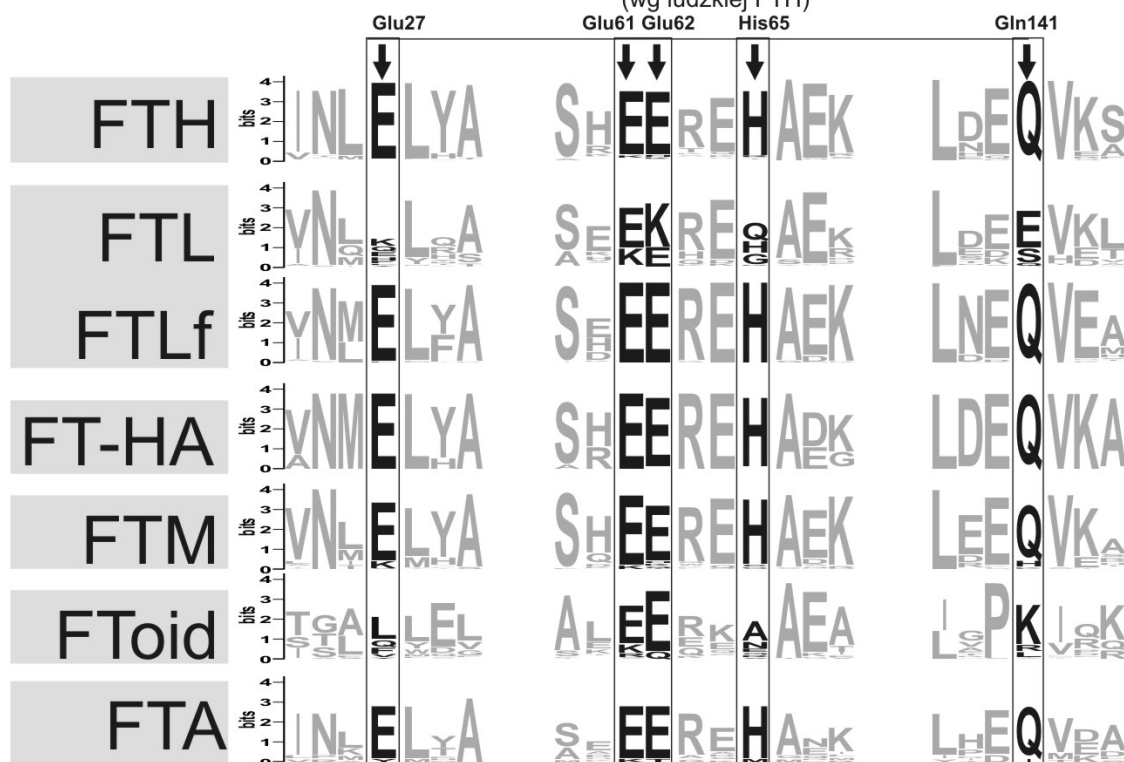


Rycina 8. Analiza filogenetyczna rodziny ferrytyn kręgowców klasyfikująca je w sześć podrodzin i izoformy (po prawej). Jako grupę zewnętrzną drzewa dla taksonów kręgowców wybrano pierwotne *Tunicata*

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że miejsce aktywne ferroksoydacji jest w większości zachowane u przedstawicieli FT. Wyjątki obejmują FTL i FToid, które nie mają konserwatywnych reszt, odpowiadających Glu27 i Gln141 w ludzkim łańcuchu FTL (Ryc. 9).

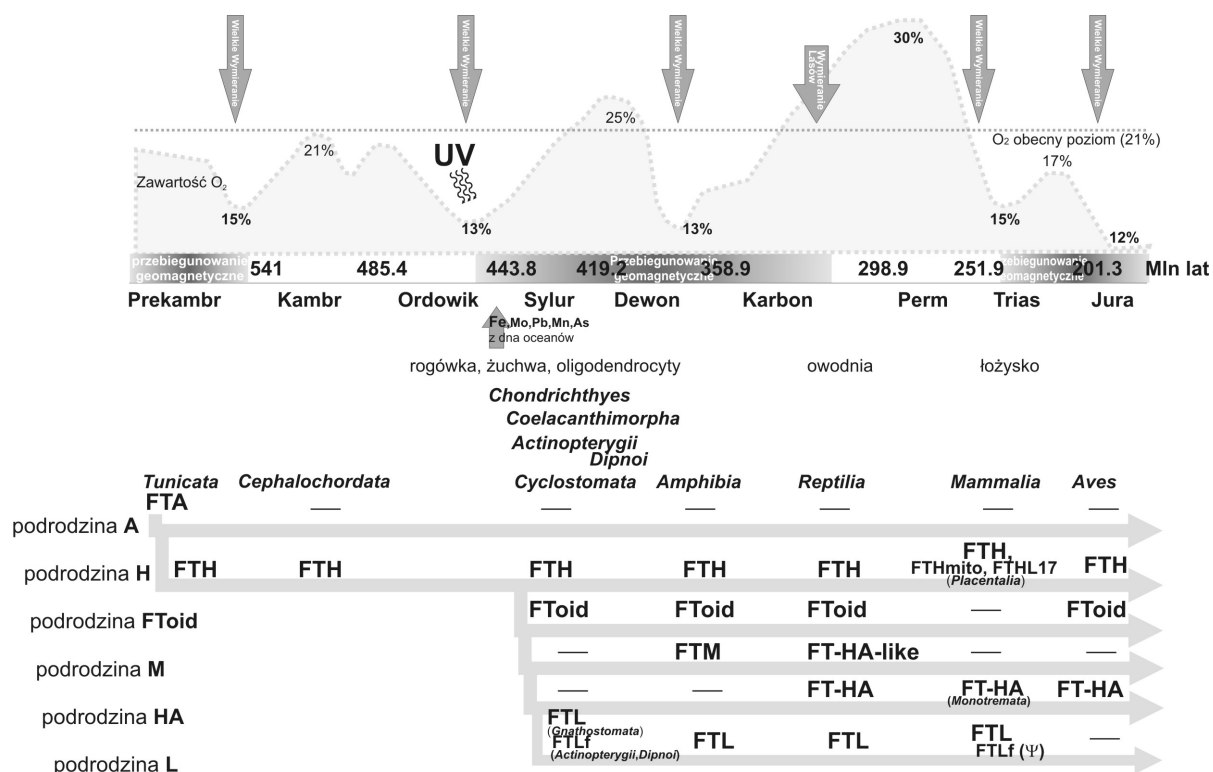
Ferroksydacja

(wg ludzkiej FTH)



Rycina 9. Analiza sekwencji sześciu podrodzin FT ze wskazaniem aminokwasów potencjalnie zaangażowanych w ferroksydację żelaza.

Spośród wszystkich zwierząt, kręgowce mają najszersze spektrum podrodzin i izoform FT. Jako organizmy wysoce zorganizowane i mobilne, w procesie ewolucji wytworzyły wyspecjalizowane systemy transportu żelaza. Umożliwiło to ich lepsze przystosowanie do zmian geologiczno-klimatycznych w historii Ziemi i do zajmowania kolejnych niszy ekologicznych. W niniejszej pracy wykazano, że FT kręgowców można podzielić na sześć podrodzin. Wyjściowe FT zostały zduplikowane i pochodziły z pierwotnych *Chordata*, takich jak *Tunicata*, podobnie jak sugerowali Lee i wsp. (2012), a nie FTH (Andrews i wsp. 1992). W niniejszej pracy wykazano również, że FT powstawały w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska (Ryc 10.).



Rycina 10. Schemat ewolucji białek z rodziny FT i nowych struktur anatomicznych, w zależności od zmieniających się warunków środowiskowych w geologicznej skali czasu.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki analiz pozwoliły na zaproponowanie nowego podziału FT oraz ich klasyfikacji funkcjonalnej, zależnej od właściwości ferroksydacyjnych (Tab. 4)

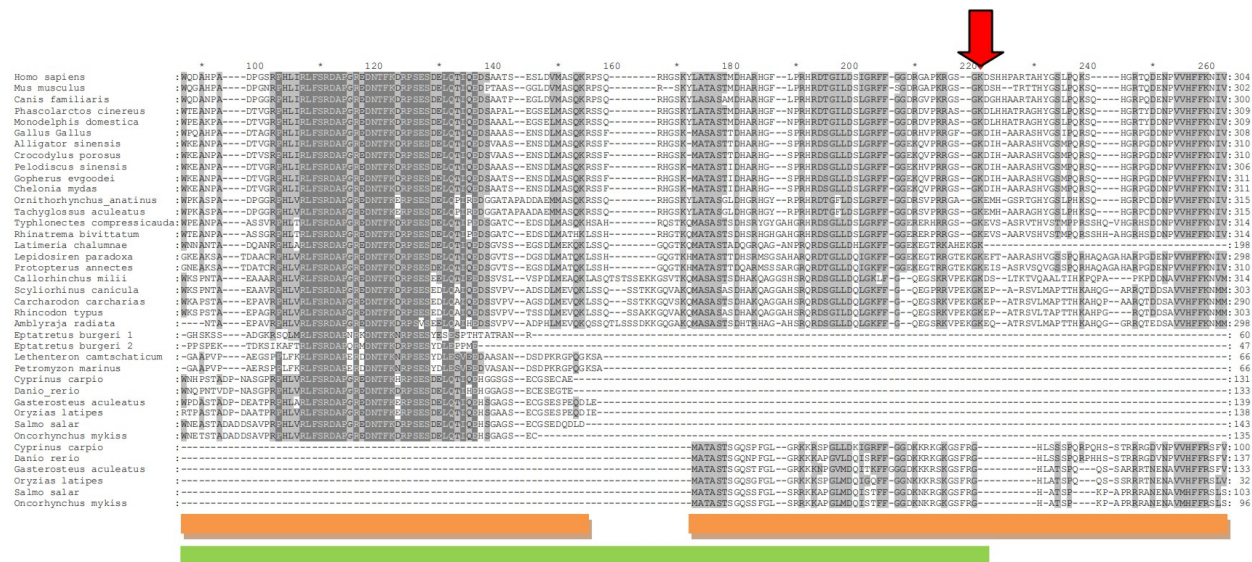
Tabela. 4. Rozmieszczenie podrodzin FT i ich zdolności ferroksydacyjnych (F+/-) wśród różnych taksonów strunowców wraz z ich skalą czasową ewolucji.

	Mln lat	FTA	FToid	FTM	FT-HA	FTH	FTL	
							F-	F+
<i>Tunicata</i> (grupa bazowa)	514-636.1	F+						
<i>Cephalochordata</i>	534-566					F+		
<i>Cyclostomata</i>	358.5-636.					F+		
<i>Chondrichthyes</i>	433.4-443		F-			F+	F-	
<i>Coelacanthimorpha</i>	407-419		F-			F+	F-	

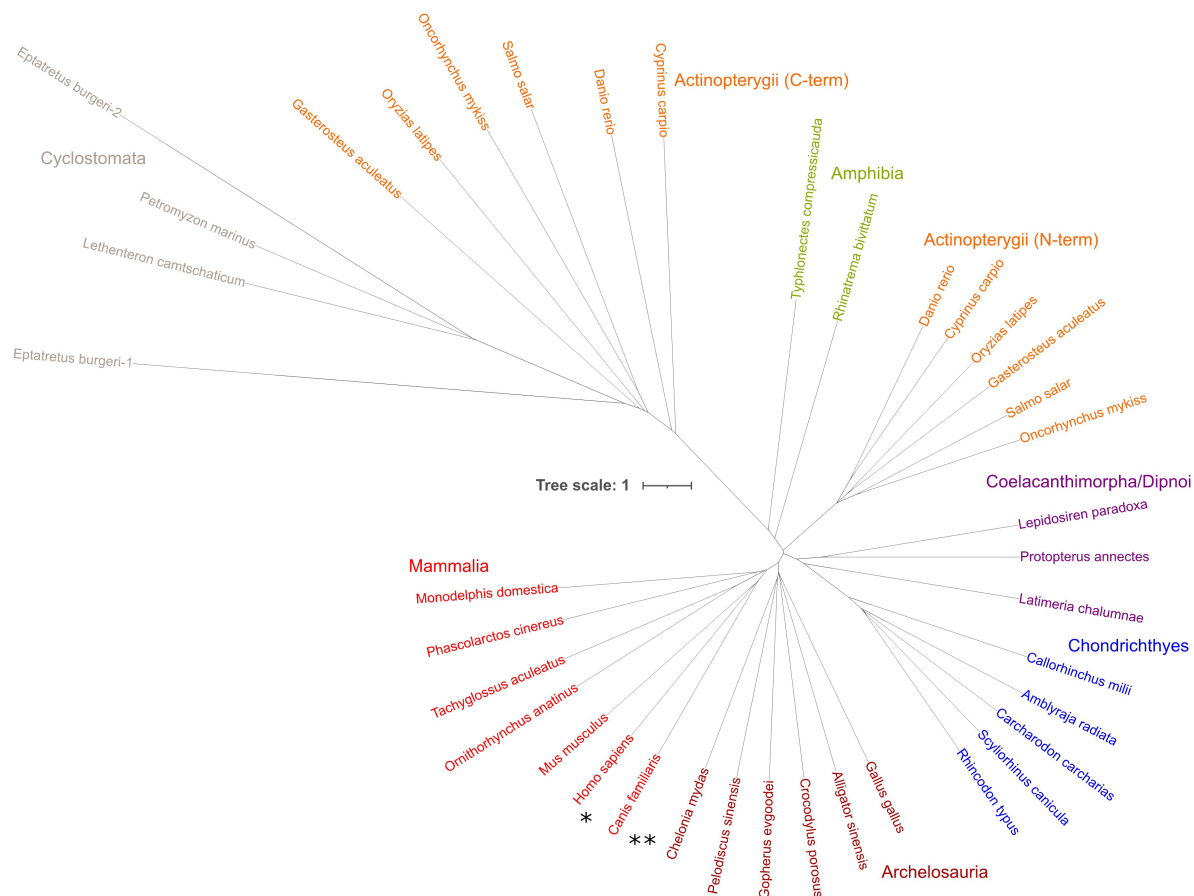
<i>Actinopterygii</i>	383-425		F-			F+	F-	F+
<i>Dipnoi</i>	380-400					F+	F-	F+
<i>Amphibia</i>	358.9-372.2		F-	F+		F+	F-	
<i>Reptilia</i>	310-320		F-	F+	F+	F+	F-	
<i>Mammalia</i>	164.9-201.5					F+	F-	F+
<i>Aves</i>	168.3-170. ¹		F-		F+	F+		

IV.2.2 Analiza filogenetyczna białka zasadowego mieliny

W niniejszych badaniach zastosowano alternatywne podejście w celu zbadania pochodzenia MBP. Przy użyciu sekwencji ludzkiego MBP (pfam PF01669, chromosom 18, Gene ID: 4155; locus LOC107987261; Acc nr NC_000018.10) przeszukano algorytmem BLAST bazę danych GenBank białek wybranych przedstawicieli kręgowych (jak opisano w materiałach i metodach) U *Latimeria* białko MBP jest krótsze i ogranicza się do N – terminalnego odcinka, wyłącznie z fragmentem Golli. U ryb promieniopłetwych MBP występuje w dwóch fragmentach, odpowiadających N – i C – końcowi białek wyższych kręgowców. Uzyskany wynik zgodny jest z wcześniejszą publikacją Nawaz i wsp. (2013) (Ryc. 11a i 11b).



Rycina 11a. Porównanie sekwencji MBP wybranych kręgowców. Pomarańczowy pasek obejmuje sekwencje ryb promieniopłetwych N- i C- terminalny fragment MBP. Kolor zielony paska obejmuje sekwencje MBP z *Latimerii*. Czerwona pionowa strzałka wskazuje miejsce złącza egzonów.



Rycina 11b Drzewo filogenetyczne sekwencji białka MBP u kręgowców ,oznaczono *człowieka ** psa

W wyniku przeszukania bazy EST GenBanku w niniejszej pracy wykazano, że u promieniopłetwych transkrypty kodujące N-terminalny fragment MBP obejmujące Golli występują we wszystkich narządach poza mózgiem. Transkrypty kodujące C-końcowy fragment MBP (klasyczne MBP) są nadreprezentowane w mózgu (Tab.5.).

Tabela 5. Lokalizacja narządowa wybranych izoform MBP u ryb

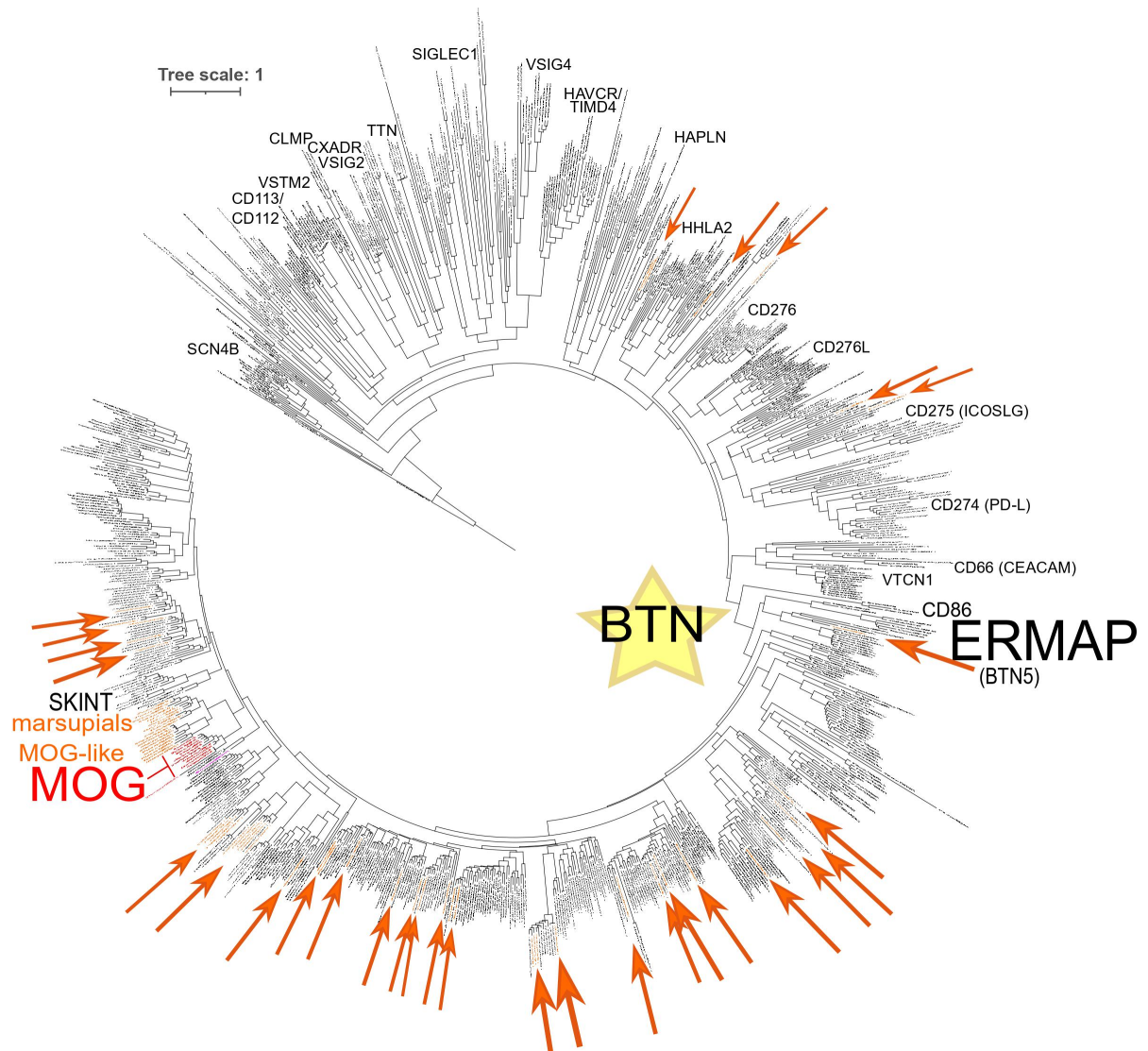
gatunek	N-term (Acc.nr)/lokalizacja	C-term (Acc.nr)/lokalizacja
Cyprinus carpio	EC393636/skóra	EX823177/mózg
Gasterosteus aculeatus	DW040825/skrzela	DW629149/larwa
Gadus morhua	GW861915/grasica	GW847171/mózg
Ictalurus punctatus	FD107287/pozostałe narządy	BM495284/mózg
Ctenopharyngo donidella	JK852233/nerki	b.d.

Carassius auratus	AM928282/nabłonek węchowy	b.d.
Gobio cyprisrarus	EE594013/skrzela	b.d.

IV.2.3 Analiza filogenetyczna białka MOG

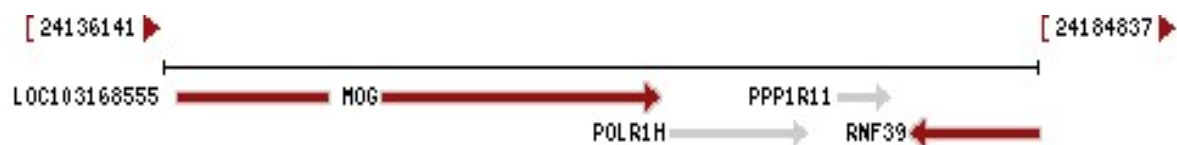
Interesujące jest, że białko MOG stwierdzono wyłącznie u ssaków, dlatego podjęto próbę wyjaśnienia pochodzenia MOG oraz genu kodującego to białko z użyciem analizy filogenetycznej.

Białko MOG należy do rodziny butyrofilin (BTN). W niniejszej dysertacji uzyskane wyniki wskazują, że sekwencje domeny V-set z białka MOG od różnych ssaków klastrują się w jedną gałąź. W zbliżonym ewolucyjnie czasie powstawały również białka MOG-like u torbaczy. Występowanie ich homologów stwierdzono również w wielu gałęziach innych grup białek. U ryb podobnie jak u ssaków stwierdzono również występowanie BTN. Wraz z pojawieniem się grupy białek ERMAP (BTN5, erythroidmembrane-associated protein) następuje ekspansja BTN u kręgowców i wzrasta częstotliwość pojawiania się białek typu MOG-like. Pojawianie się MOG u ssaków zbiega się w czasie również z obecnością białek MOG-like. U torbaczy domena V-set o wysokim podobieństwie do MOG występuje w wielu sekwencjach białek MOG-like, które nie są specyficzne dla mózgu, a występują np.: w mleku (Acc.nr. GEDN01009057), sercu i wątrobie (Acc.nr. GHKB01048664), śledzionie, nerkach (Acc.nr. GFSS01205855) **(Ryc. 12)**



Rycina 12. Drzewo filogenetyczne białka MOG * oznaczono rodzinę butyrofilin. Kolorem pomarańczowym oznaczono gen MOG – like torbaczy. Kolorem czerwonym oznaczono MOG

Obserwacja domeny V-set pojawiającej się ewolucyjnie w wielu białkach, w podobnym czasie, była podstawą hipotezy czy DNA kodujące V-set nie wykazuje cech elementu transpozycyjnego. W genomie dziobaka (*Ornithorhynchus anatinus*) występuje gen kodujący białko MOG (locus XM_029054900) oraz gen kodujący białko o wysokim podobieństwie (76%, locus LOC114808702) zlokalizowany na chromosomie Y. Analiza sekwencji tego genu wykazała, że powstał na skutek duplikacji i fuzji genu MOG i genu RNF39 (RING) oraz translokacji hybrydowej kopii na chromosom Y (Ryc.13). To sugeruje, że domena V-set może być dynamiczna, czyli ciągle ulegać transpozycji.

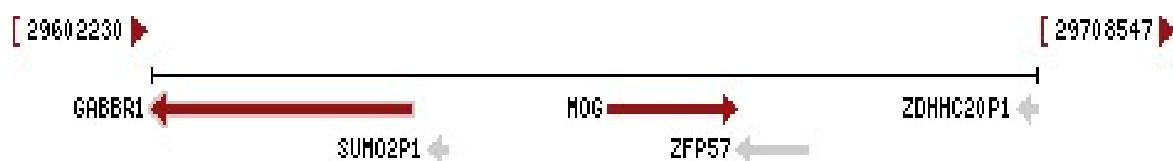


Rycina 13. Organizacja genomowa MOG u dziobaka oraz genu RNF39.

Dane ekspresji genów w narządach różnych zwierząt przedstawia baza Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>), na podstawie której dokonano analizy danych ekspresji MOG w różnych narządach i tkankach. Wykazano, że ekspresja genu kodującego MOG występuje w OUN u człowieka, pawiana i monodelfa, natomiast u innych małych naczelnych (kotawiec, makak) niska ekspresja genu MOG wykrywana jest w fibroblastach, krwinkach, nerkach, sercu oraz gonadach męskich. U pozostałych zwierząt (świnia, krowa, szczur, mysz, królik, koń) zaobserwowano ekspresję w wielu innych narządach.

Dokonano również analizy *in silico* występowania białka MOG w oparciu o proteomiczną bazę danych Proteintlas. Interpretacja wyników z ludzkiej bazy danych Proteintlas wykazała występowanie MOG tylko w OUN, (głównie w OLG) (<https://www.proteintlas.org/ENSG00000204655-MOG/tissue>)

OLG u ludzi są specyficznym miejscem występowania MOG, dlatego postanowiono zbadać *in silico*, czy promotor tego genu determinuje jego selektywną ekspresję w OUN. U ludzi organizacja locus *MOG* jest podobna jak u innych ssaków. Region promotora jest współdzielony z przeciwrównolegle skierowaną otwartą ramką odczytu genu *GABBR1*, kodującego receptor GABA (Ryc. 14.)



Rycina 14 Schemat przedstawiający region promotora MOG. Czerwonym kolorem zaznaczono ORF genu MOG i sąsiedniego GABBR1.

W niniejszej pracy wykonano również analizę promotora ludzkiego genu MOG (długości 3868 pz). Poszukując sekwencji wiązania czynników transkrypcyjnych (TF), które potencjalnie wiążą się i mogą być odpowiedzialne za ekspresję, użyto danych z bazy TF2DNA. Przeanalizowano lokalizację tkankową TF w oparciu bazę Proteintlas, skupiając się na regulatorach specyficznych tkankowo dla OUN (Tab.6).

Tabela 6. Lista TF, zidentyfikowanych jako potencjalnie wiążące się do sekwencji promotorowej ludzkiego genu MOG wg bazy TF2DNA. Kolorem żółtym wyróżniono białka mózgowo-specyficzne lub nadreprezentowane w OUN.

Akronim nazwy białka	Pełna nazwa białka i funkcja	Lokalizacja (wg Proteinatlas)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	większość tkanek
HOXD11	homeobox D11	Większość tkanek
RXRA	retinoid X receptor, alpha	Większość tkanek
RUNX3	runt-related transcription factor 3	Większość tkanek
PROX1	PROX paired-like homeobox 1	przysadka
TFAP4	transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4)	Większość tkanek
NR1H3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	wątroba
ZNF648	Zinc finger protein	Niska ekspresja, mózg
ZNF347	zincfinger protein	Większość tkanek
ZNF536	zinc finger protein	głównie mózg
CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3-like	Większość tkanek
ZBTB22	chr6 zinc finger and BTB domain containing	Większość tkanek
ZNF177	zincfinger protein 177	Jądra (gonady)
ZNF441	zincfinger protein 441	Większość tkanek
ZNF267	zincfinger protein 267	Większość tkanek
EGR1	early growth response 1	Większość tkanek
ZSCAN20	zinc finger and SCAN domain containing 20	Większość tkanek
RXRG	retinoid X receptor, gamma	Większość tkanek
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-	Większość tkanek

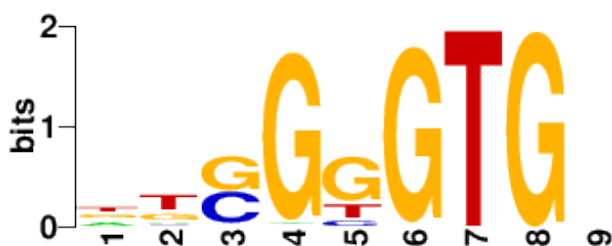
	cells 1	
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	Większość tkanek
SRF	chr6 serum responsefactor	Większość tkanek
NR1H4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Układ pokarmowy, wydalniczy i endokryny
TP63	tumor protein p63	Liczne tkanki
TEAD4	TEA domain family member 4	Większość tkanek
SPI1	Spi-1 proto-oncogene	Większość tkanek
RORA	RAR-related orphan receptor A	Większość tkanek
TEAD3	chr6 TEA domain family member 3	Większość tkanek
FOXD3	forkheadbox D3	mózg
KLF1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	szpik
ARNT2	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	Głównie mózg
HOXD4	homeobox D4	Głównie mózg
POU3F2	chr6 POU class 3 homeobox 2	mózg

Dodatkowo wytypowano TF występujące specyficznie w OUN lub będące nadreprezentowanymi w OUN. Porównano je z TF potencjalnie odpowiedzialnymi za ekspresję przeciwrównoległego sąsiedniego genu GABBR1. Spośród zestawionych TF, ARNT2 wydaje się być odpowiedzialny za specyficzność ekspresji MOG w mózgu, ponieważ również aktywuje GABBR1 (Tab.7.)

Tabela 7 Lista TF potencjalnie wiążących się i odpowiedzialnych za ekspresję genu MOG i GABBR1. Na żółto zaznaczono czynniki specyficznym występujące w układzie nerwowym.

locus MOG i sąsiedztwo	MOG	GABBR1
czynniki transkrypcyjne, występujące głównie w OUN	PROP1	NHLH1
	ZNF536	EBF1
	FOXD3	EGR3
	ARNT2	ZIC1
	HOXD4	OTX2
	POU3F2	ARNT2
		GLIS1
		TFAP2B
		VSX1
		HES7
		EGR4
		SCRT1
		ZFP57
		ZMAT4
		POU4F1
	ZIC5	
	FEZF1	
	SP8	
	ZNF705A	

Ryc. 15A przedstawia konsensus sekwencji rozpoznawanej przez ARNT2. Rozpoznaje on sekwencję nukleotydową GkGTG, występującą potencjalnie w 5-ciu miejscach w promotorze MOG (~600 pz.) (Ryc. 15 B).



Rycina 15 A Konsensus sekwencji rozpoznawanej przez ARNT2.



Rycina 15 B Schematyczny obraz promotora ludzkiego genu *MOG* z potencjalnymi miejscami wiązania TF, z wyróżnieniem miejsc wiązania ARNT2 na zielono.

Badania autorów prowadzone na liniach komórkowych gryzoni dostarczyły dodatkowych informacji, dotyczących promotora genu *MOG*, gdzie wykazano wiązanie TF CREB i jego funkcję regulatorową (Jaquet i wsp., 1999; Solly i wsp., 1997; Jana i wsp., 2018). CREB jest TF typu bZIP powszechnie występującym we wszystkich typach komórek. Na Ryc.16. Przedstawiono konsensus sekwencji DNA wiążącej TF CREB.

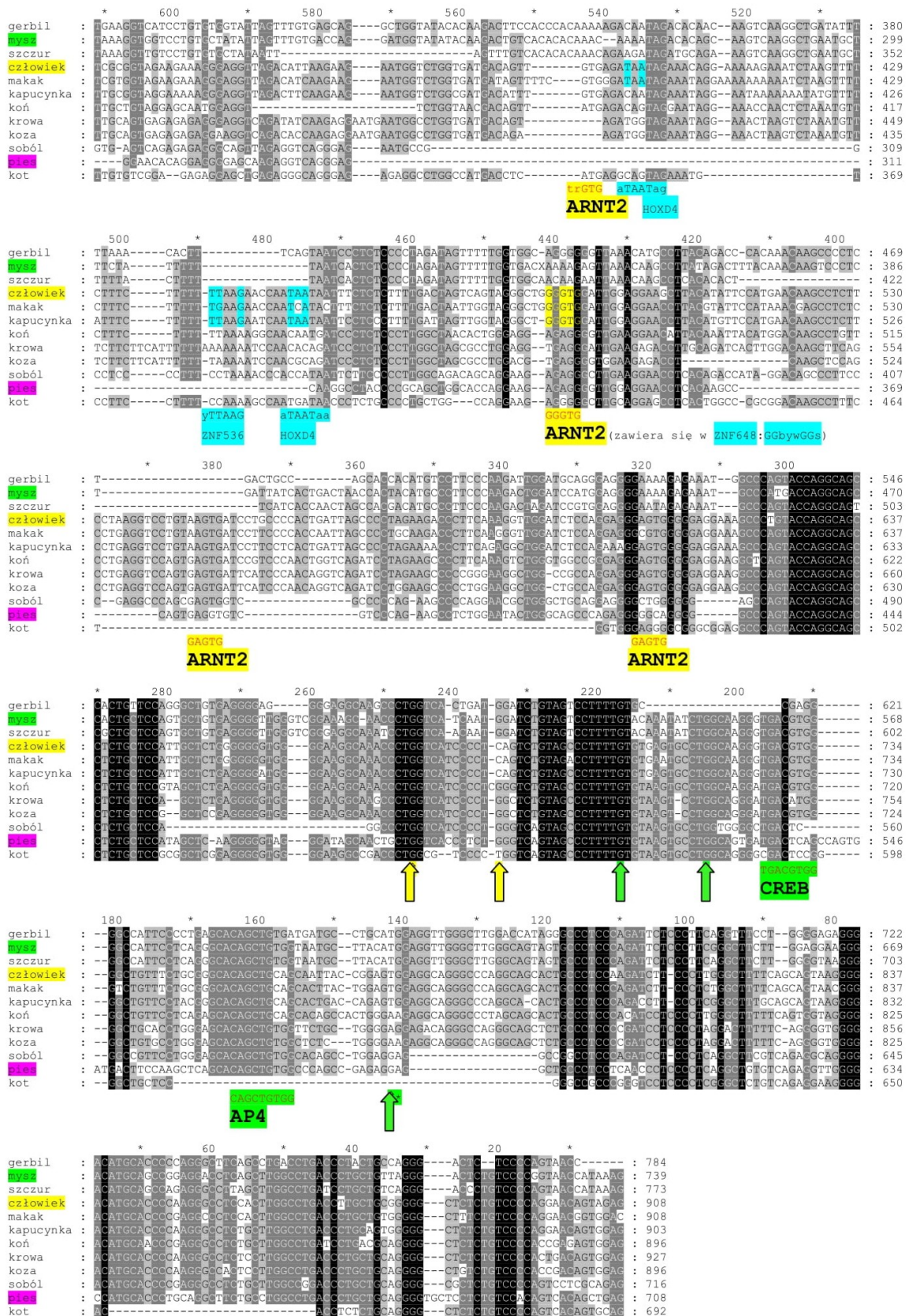


Rycina 16 Konsensus sekwencji DNA rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny CREB, według bazy TF2DNA .

W niniejszej pracy porównano sekwencje promotorowe genu *MOG* ludzkiego z odpowiednimi sekwencjami przedstawicieli innych naczelnymi, mięsożernymi (pies) kopytnymi i gryzoniemi (Ryc 17).

W sekwencji niekodującej promotora ludzkiego *MOG* znaleziono miejsce wiązania dla CREB1, odpowiadającemu regionowi miejsca wiązania CREB u myszy (Ryc, X12), jednakże znajduje się ono w poniżej sekwencji promotora potencjalnie

wiążącej TF ARNT2. Drugie zidentyfikowane przez autorów białko AP4 jest ogólnym TF, odpowiedzialnym za różnicowanie się komórek, w tym OUN (Kim i wsp., 2006). Na podstawie danych transkryptomicznych (baza danych GENE BANK, transkrypty Acc. nr: BY127313, AU067234, BY232480, BY128029, BY232093*ucho wewnętrzne-mysz, DA253273, DA139582-człowiek) można spekulować, że wyznaczone przez autorów (Jaquet i wsp, 1999) miejsce wiązania CREB i AP4 *in vitro*, znajdują się w niekodującej sekwencji 5'UTR transkryptu (Ryc. 17), czyli poniżej sekwencji właściwego promotora. Tym samym, autorzy pracy mogli popełnić błąd metodyczny wyznaczając *in vitro* miejsce sekwencji regulatorowych.



Rycina 17 .Porównanie proksymalnej sekwencji promotorów genu *MOG* u gryzoni, naczelnych, kopytnych i mięsożernych (o długości ~600 pz.). Potencjalne miejsca wiązania TF ARNT2 zaznaczono na żółto, potencjalne miejsca dwóch innych TF,

specyficznych mózgowo, HOXD4 i ZNF536 zaznaczono na niebiesko, natomiast miejsce wiązania CREB zaznaczono na zielono. Pionowe strzałki wyznaczają miejsca startu transkrypcji wyznaczone na podstawie danych transkryptomicznych z bazy GENEBANK.

V. Dyskusja

OLG powstały w celu zapewnienia lepszej ochrony neuronom oraz w odpowiedzi na fluktuacje niekorzystnych warunków środowiskowych. Dynamika rozwoju układu nerwowego kręgowców, powstawanie nowych skomplikowanych połączeń pomiędzy neuronami oraz wzmocnienie ochrony neuronów w sposób istotny wpłynęło na ewolucję tych komórek glejowych (Hines, 2021).

Wyniki badań własnych przeprowadzone w wybranych obszarach mózgowia u kobiet i mężczyzn oraz u samic i samców psa są podobne do uzyskanych przez innych autorów. Dotychczasowe badania nad morfologią i biologią OLG dotyczyły głównie osobników młodych, bez w pełni zakończonego procesu mielinizacji. Badania dotyczące starszych osobników, najczęściej dotyczyły małp i gryzoni (Peters i wsp., 2010; Cavallotti i wsp., 2001). U małp człekokształtnych stwierdzono, że wraz z wiekiem dochodzi do pogorszenia zdolności poznawczych (Vaughan i Peters 1974, Cavallotti i wsp., 2001, Murtie i wsp., 2007, Peters 2009, Peters i Connor 2014). Aktualne prace dotyczą morfologii i lokalizacji OLG w wybranych obszarach mózgu owcy (*Ovis aries*) i kangura rudego (*Macropus rufus*) (Wawrzyniak i wsp., 2022a; Wawrzyniak i wsp., 2022b).

LF oraz Hip to obszary w głównej mierze zbudowane z neuronów, naczyń krwionośnych, włókien nerwowych oraz różnych rodzajów komórek glejowych. W obszarze CC dominują włókna nerwowe, komórki glejowe oraz naczynia krwionośne, a neurony stanowią tu nieliczną populację. OLG substancji szarej i białej wykazują podobną morfologię, chociaż różnią się lokalizacją względem struktur charakterystycznych dla określonego obszaru mózgowia. W badaniach własnych wykazano, że obszarem Hip z dużą liczbą OLG była warstwa SLM. Większość aksonów otoczonych osłonką mielinową znajdujących się w tym obszarze pochodzi z kory śródwęchowej (*cortex entorhinalis*), a to być może związane jest z początkiem dojrzewania OLG rozpoczynających mielinizację oraz ich ścisłym powiązaniem z włóknami i osłonką mielinową. (Berger i Frotscher 1994, Vinet i wsp., 2010). Najprawdopodobniej wypustki OLG mogą mielinizować aksony poza rejonem Hip oraz wpływać na regulację przewodnictwa nerwowego w warstwie molekularnej GD lub w obszarze CA3, w którym znajdują się włókna nerwowe zmielinizowane. (Lin i Bergles 2004, Vinet i wsp., 2010). W Hip, aksony pochodzą z różnych źródeł i są w różny sposób podzielone. Wejścia śródwęchowe znajdują się głównie w warstwie SLM pół Hip oraz w warstwie molekularnej GD. Aksony łączące komórki piramidalne pola CA3 i CA1

dochodzą do neuronów znajdujących się w warstwie SR i SO. Taka lokalizacja włókien sugerowałaby, że OLG są rozdzielone przestrzennie w określonej warstwie Hip. W badaniach własnych na preparatach nieliczne OLG występowały pojedynczo pomiędzy neuronami w polu CA2 i CA3 oraz tylko gdzieś w polu CA1. Te komórki glejowe, obecne były pomiędzy włóknami pochodzącymi z kory śródwęchowej, neuronami warstwy SLM oraz na całej szerokości warstw SR i SO. Obecność OLG pod warstwą komórek ziarnistych, może świadczyć o ich uczestnictwie w mielinizacji aksonów pochodzących od tych komórek (Woodhams i wsp., 1981, Lin i Bergles 2004, Vinet i wsp., 2010).

W wyniku przeprowadzonych badań przy zastosowaniu wybiórczej i selektywnej metody barwienia srebrem, u ludzi i psów w wybranych obszarach OUN zaobserwowano podobne rozmieszczenie OLG. W LF OLG najczęściej lokalizowały się w dolnych warstwach tj. IV/VI, co wiązało się z lokalizacją w pobliżu CC, bogatego we włókna nerwowe. Obserwacje własne są zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Vaughana i Petersa oraz LeVine i Torres, którzy badali OLG w korze mózgu u myszy i szczurów (Vaughan i Peters, 1974; LeVine i Torres, 1993). U 25-letnich małp w obszarze kory mózgu stwierdzono, że niektóre wypustki OLG łączą się ze sobą i zawierają wtręty różnej wielkości oraz gęstości elektronowej. Niektórzy autorzy uważają, że są to specyficzne markery strukturalne związane ze starzeniem się OLG i mogą być wykorzystane do syntezy osłonek mielinowych, odnawianych w trakcie starzenia, a tym samym przyczyniają się do zmian przewodnictwa nerwowego oraz są czynnikiem starzenia u naczelnych (Monteiro i wsp., 1995, Sturrock 1983, Peters 2009).

Mózgowie posiada niezwykle możliwości samonaprawy, a wraz z wiekiem, zdolność do procesu remielinizacji ulega spowolnieniu lub zostaje całkowicie utracona (Nave 2010a, 2010b). Wyniki badań własnych oraz innych autorów w obszarze mocno zmielinizowanym tj. w CC u ludzi i psów sugerują, że OLG nawet u dorosłych osobników są zdolne do oddziaływania na osłonki mielinowe. (Yin i wsp., 1997). Być może składniki zawarte w OLG lub specyficzne dla tych komórek glejowych receptory mogą uczestniczyć bezpośrednio w formowaniu osłonki mielinowej lub wzbogacać mielinę (Rasband i wsp., 2005). LF połączona jest z CC i jest miejscem pamięci przestrzennej (Gazzaniga 2000). Ponadto mielinizacja zachodząca w CC jest ściśle skorelowana z obszarami LF (Bloom i Hynd 2005). Być może proces mielinizacji, w który zaangażowane są OLG wpływa bezpośrednio lub pośrednio na mechanizm uczenia przestrzennego (Zhao i wsp., 2011).

W wyniku zastosowanych w niniejszej pracy metod badawczych potwierdzono, że lokalizacja i morfologia OLG jest obrazem uniwersalnym dla wielu gatunków ssaków i odzwierciedla ich funkcję, jako komórek wspomagających wzrost i zapewniających ochronę neuronom (Dai i wsp., 2003). W badaniach własnych impregnacji tkanki glejowej solami srebra uwidoczniono ciemnobrązowe ciała OLG, od których odchodziły najczęściej ciemne, krótkie, pojedyncze wypustki. OLG głównie układały się przy neuronach lub w sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Taki obraz uzyskano podczas obserwacji preparatów u ludzi i psów. Podobne wyniki na poziomie mikroskopu świetlnego obserwowano u myszy i szczurów (Ogawa i wsp., 1975, LeVine i Torres 1993, Murtie i wsp., 2007). Cechą charakterystyczną obserwacji OLG Hip była ich lokalizacja przy lub w pobliżu naczyń krwionośnych, bez równoczesnej obserwacji wypustek astrocytów. OLG mają ogromne zapotrzebowanie na żelazo w celu produkcji mieliny i są głównymi komórkami OUN zaangażowanymi w transport żelaza z krwi do mózgowia. Ich bliskość z naczyniami włosowatymi może wyjaśniać znaczenie tych komórek w uczestnictwie oraz utrzymaniu bariery krew - mózg (Del Zoppo i wsp., 2006, Connor i Menzies 1996, Burdo i wsp., 1999, Pinero i Connor 2000, Todorich i wsp., 2011, Simpson i wsp., 2015).

Komórkowy rozdział białek związanych z żelazem w mózgowiach ludzi i psów jest w dużym stopniu zgodny z obserwacjami innych autorów wykonanych w mózgowiach człowieka, szczura i myszy (LeVine i Macklin 1990, Connor i wsp., 1995). We wszystkich tych badaniach wykazano, że głównymi komórkami zawierającymi żelazo są OLG. Wiadomo, że komórki te włączone są w syntezę i utrzymywanie osłonki mielinowej, natomiast rola żelaza w procesie mielinizacji nie jest do końca poznana. Żelazo jest bezpośrednio zaangażowane w syntezę bogatych w mielinie cholesterolu i lipidów (Connor i Menzies 1996, Leitner i Connor 2012, Simpson i wsp., 2015). Rola żelaza w mielinogenezie oraz regeneracji osłonki mielinowej sugeruje, że niedobór żelaza u ssaków związany jest z hipomielinizacją (Connor i Menzies 1995, Leitner i Connor 2012).

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia oraz porównania dystrybucji regionalnej i komórkowej żelaza w mózgowiach u ludzi i psów. Wyniki własne uzyskane przy użyciu metody srebrowej zostały potwierdzone obserwacjami skrawków wybarwionych metodą histochemiczną na obecność żelaza. W LF wzór lokalizacji oraz umiejscowienie OLG odpowiadało ich rozmieszczeniu wykazanemu w komórkach poddanych impregnacji solami srebra. OLG zawierały produkt reakcji histochemicznej na

obecność żelaza. w cytoplazmie oraz wypustkach. Obserwacje własne były podobne do tych, które wykonali Fukunaga i wsp.. (2010) u ludzi oraz Le Vine i Torres (1993) u myszy. Potwierdzono obserwowaną przez innych autorów lokalizację OLG w pobliżu naczyń krwionośnych (Ogawa i wsp., 1975), co przemawia za ich udziałem w dostarczaniu substancji odżywczych do neuronu, jak i potwierdza ich udział w ochronie neuronu przed niekontrolowanymi wpływami wewnętrznymi (Dai i wsp., 2003). W LF OLG zawierające żelazo były widoczne głównie w warstwach położonych w pobliżu CC i wiele tych komórek lokalizowało się w przy neuronach sugerując, że mogą one brać udział w transporcie żelaza do i z komórek nerwowych. Stwierdzony obraz barwienia na obecność żelaza w OLG, pokrywa się z wcześniejszymi obserwacjami (Connor i wsp., 1995; LeVine i Macklin 1990; Wawrzyniak i wsp., 2022a; Wawrzyniak i wsp., 2022b), potwierdzając rolę OLG w gospodarce żelaza oraz w utrzymaniu stanu równowagi chemicznej w mózgu (Rosato-Siri i wsp., 2023).

Żelazo poprzez swoją kluczową rolę w funkcjach życiowych komórek jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Jest kofaktorem w syntezie neuroprzekazników i mieliny, oraz jest niezbędnym czynnikiem troficznym podczas zużycia tlenu i wytwarzania ATP (Connor i wsp., 1995, Connor i Menzies 1996, Pinero i Connor 2000. Rozkład żelaza jest różny, a obserwacja własna w badanych obszarach OUN u ludzi i psów jest podobna do tej dokonanej przez innych autorów u ludzi w korze mózgu i mózdzku, opuszce węchowej, ciele prążkowanym, Hip oraz ciele migdałowatym (Connor 1995, Connor i Menzies 1996, Pinero i Connor 2000, Simpson i wsp., 2015).

Funkcjonalnie obszary bogate w żelazo zaangażowane są w kontrole motoryczne. Potwierdza to ich zaangażowanie w zaburzenia motoryczne, których przyczyną jest niedobór żelaza podczas rozwoju. Badania chorych na chorobę Parkinsona (PD), wykazały, że obszary te mogą być bardziej podatne na powstawanie wolnych rodników, a tym samym przyczyniać się do śmierci komórki (Visanji i wsp.2013). Obszary mózgowia, które nie są szczególnie bogate w żelazo, jak na przykład Hip, posiadają stosunkowo wysokie ilości receptora typu TF (TFR) (Mash i wsp., 1990). OLG same nie syntetyzują żelaza, dlatego muszą go nabywać (Connor i Menzies 1995, Connor 2004, Simpson i wsp., 2015). Najczęstsze objawy neurologiczne niedoboru żelaza to zmniejszone zdolności poznawcze oraz problemy w zachowaniu (Grantham-McGregor i Ani 2001). Mielina pełni ważną rolę w uczeniu się i pamięci, a jej degradacja jest głównym elementem składowym w patogenezie zaburzeń neurologicznych związanych

z funkcjami poznawczymi. Dorosłe mózgowia charakteryzują się zmianami morfologicznymi zarówno w neuronach jak i neurogleju, które przyczyniają się do zmian neurochemicznych oraz neurodegeneracyjnych. Badania na poziomie molekularnym oraz biochemicznym, mogą dostarczyć odpowiedzi, która pozwoli zrozumieć etiologię chorób demielinizacyjnych oraz procesy starzenia (Zhang i wsp. 2002).

Udomowieniu psa towarzyszyły zmiany behawioralne, neurofizjologiczne i neuroanatomiczne, w zakresie przeobrażeń połączeń funkcjonalnych w obszarach mózgu odpowiedzialnych za interakcje społeczne (Perri i wsp., 2021. Herbeck i wsp., 2021). Jako zwierzęta stale towarzyszące człowiekowi, współdzielące z nim środowisko życia, psy podlegają takiej samej presji czynników środowiskowych. Niekorzystny ich wpływ w istotny sposób oddziałuje na stan zdrowia, powodując występowanie podobnych chorób cywilizacyjnych jak u ludzi np.: nowotwory (Marchi i wsp., 2022), cukrzycę (Del Baldo i wsp., 2022), choroby stawów i układu kostnego (Barbeau-Grégoire i wsp., 2022), choroby układu krążenia (Pires i wsp.,). W chorobach układu nerwowego dochodzi do redukcji całkowitej gęstości i liczby OLG (Pakkenberg 1990, Uranova i wsp. 2001, 2004). Zmniejszenie gęstości OLG wykazano w warstwie VI LF np. w schizofrenii oraz afektywnej chorobie dwubiegunowej, natomiast nie odnotowano zmniejszenia liczby OLG w warstwie LF sąsiadującej z istotą białą. Powodem tego może być obecność dwóch populacji OLG. W warstwie VI LF OLG służą głównie jako satelity neuronom, podczas gdy w istocie białej aktywnie uczestniczą w tworzeniu osłonek mielinowych. Zmniejszenie gęstości OLG w warstwie VI LF może odzwierciedlać zakłócenia OLG/neuron w patologii OUN, a tym samym wywołując zmniejszenie aktywności metabolicznej neuronów (Sánchez-Abarca i wsp. 2001).

Mimo znacznego dystansu filogenetycznego pomiędzy *Primates* i *Carnivora* (Murphy i wsp., 2001) w niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych różnic w morfologii i dystrybucji OLG w badanych obszarach mózgu. Sugeruje to, że proces mielinizacji i jego regulacja powstały wcześniej u kręgowców i są zachowane rozwojowo, oraz przebiegają w podobny sposób u większości ssaków. Psy zapadają na choroby neurologiczne oraz te związane z podeszłym wiekiem o etiopatologii podobnej do ludzi. Komórki glejowe, w tym OLG są zaangażowane w patogenezę wielu chorób neurologicznych. Jedną z takich chorób, w przebiegu której zaburzone jest funkcjonowanie OLG to padaczka. Podczas tej choroby w OLG dochodzi do dysfunkcji kanałów potasowych, które wykazują nadmierną aktywność. Dodatkowo dochodzi do zmiany struktury osłonek mielinowych, które nie zapewniają dostatecznej izolacji

neuronom (Shen i wsp., 2023). Dotychczasowe badania przeprowadzane u psów wskazują, że te zwierzęta mogą być naturalnym modelem terapeutycznym i diagnostycznym dla padaczki. Tym samym stwarzają potencjalne możliwości testowania protokołów leczenia tego schorzenia u ludzi. U psów, w trakcie przeprowadzanych badań stwierdzono zbliżony przebieg choroby, analogiczną lekooporność, porównywalny obraz w EEG, odpowiadający prezentacji klinicznej padaczki u człowieka. Widoczne zmiany dotyczyły układu limbicznego, a w szczególności obszaru Hip i zakrętu obręczy. Najważniejszą cechą psa, jako naturalnego modelu są relatywnie duże rozmiary mózgu, w porównaniu do powszechnie używanych myszy i szczurów, a także rozmiar czaszki, pozwalający na używanie EEG (Löscher, 2022).

W mózgach starzejących się psów stwierdzono zmiany neuropatologiczne, typowe dla choroby Alzheimera (AD). Stwierdzono odkładanie różnych form β -amyloidu i ich dystrybucji w poszczególnych strukturach mózgu, podobnych do tych, które są typowe dla pacjentów z AD (Mehta i Schneider, 2023). Stwierdzono też podobne poziomy β -amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym, który u ludzi jest jednym ze wskaźników procesu chorobowego. W ostatnich latach potwierdzono w mózgach starych psów obecność drugiego z neuropatologicznych markerów AD – złogów hiperfosforylowanego białka MAP-tau (Ainani i wsp., 2023). U psów podobnie jak u ludzi, stwierdzono typowe dla AD zmiany demielinizacyjne związane z atrofią mózgu. Ponadto stwierdzono uszkodzenia OLG, oraz odkładanie złogów β -amyloidu w tych komórkach glejowych. U ludzi i psów w przebiegu tej choroby dochodzi do pogorszenia procesów poznawczych i funkcjonowania, oraz zmian behawioralnych. Na podstawie analizy dostępnych danych można wysunąć wniosek, że pies jest dobrym modelem badawczym w etiologii tej choroby (MacQuiddy i wsp, 2022).

Kolejną chorobą związaną z dysfunkcją OLG jest mielopatia zwyrodnieniowa psów, przebiegająca z silną demielinizacją oraz zanikiem mięśni. Bardzo często związana jest z mutacjami w genie *SOD1*. Objawy obejmują utratę koordynacji z powodu asymetrycznej ataksji proprioceptywnej i asymetrycznego niedowładu spastycznego, który przechodzi w paraplegię w ciągu 1-szego roku od diagnozy. Chorobę tę nazwano przewlekłą zwyrodnieniową radikulomielopatią, ponieważ pierwsze opisy objawów klinicznych dotyczyły hiporefleksji rzepek i zajęcia korzeni nerwowych. Z powodu charakterystycznych objawów i typowego dla stwardnienia zanikowego bocznego (ALS–

amyotrophic lateral sclerosis) obrazu histologicznego, jak u ludzi, psy cierpiące na tę chorobę uważa się za naturalny model ALS (Nardone i wsp., 2016).

Zastosowanie dysektora optycznego dla skrawków wybarwionych metodą Nissla w badaniach własnych, posłużyło do oszacowania gęstości OLG w wybranych strukturach mózgowia u człowieka i psa. Komórki liczone były, gdy pierwszy wyraźny obraz jądra był ostry w dysektorze optycznym (Gundersen i wsp., 1988). Zastosowanie metody morfometrycznej pozwoliło uzyskać bezstronne wyniki gęstości OLG w obszarach LF, Hip oraz CC (Korbo i wsp., 1990). Zasady anatomiczne dotyczące odpowiednich obszarów są w miarę jednorodne i istnieją makroskopowe anatomiczne punkty orientacyjne, które mogą być używane do precyzyjnego identyfikowania badanych obszarów (Korbo i wsp., 1990). W badaniach własnych dokonano bezstronnego oszacowanie gęstości OLG w LF, Hip, oraz CC u kobiet, mężczyzn oraz u samców i samic psów. Wielkość, kształt i orientacja OLG w substancji białej są różne i nie do końca znany jest związek pomiędzy dwuwymiarowością powierzchni OLG. Gęstość komórek uzyskuje się z przestrzeni trójwymiarowej, a ich objętość jest możliwa do obliczenia gdy wielkości te są porównywalne. Występują jednak pewne ograniczenia dotyczące np. grubości skrawków. Wyniki badań własnych u człowieka w badanych obszarach OUN nie wykazały istotnych różnic pomiędzy badanymi obszarami mózgowia oraz pomiędzy mężczyznami, a kobietami. Jedynym obszarem u psów dla którego stwierdzono statystyczną istotność różnic, pomiędzy samcami i samicami, był obszar LF. Znaczącym aspektem mózgowia zwłaszcza u ludzi, w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt, są jego duże rozmiary, a wysoka liczba neuronów w obszarze LF ssaków podlega ciągłym zmianom gęstości komórkowej. Jest to jeden z czynników wpływających na zmiany zwłaszcza pomiędzy warstwami i być może większa gęstość komórkowa zwłaszcza w tym obszarze ma związek z plastycznością mózgowia (Dombrowski i wsp., 2001).

W ciągu ostatnich lat zaobserwowano znaczny spadek badań eksperymentalnych stosowanych w medycynie z wykorzystaniem psa, jako modelu badawczego. Jest to spowodowane wysokimi kosztami takich badań, oraz wprowadzeniem nowych regulacji prawnych Instytucji kontrolujących badania nad zwierzętami (Schulte i Arlt, 2022). Jednocześnie zwiększa się liczba badań i publikacji, ukazujących psy, jako naturalne modele wielu chorób, typowych dla człowieka. Związane jest to długością życia psów, narażeniem na podobne czynniki środowiskowe jakie mają wpływ na zdrowie człowieka,

oraz większe rozmiary ciała, w porównaniu do typowo używanych gryzoni (Lairmore i Khanna, 2014; Partridge i Rossmeisl, 2020).

Mielinizacja aksonów przez OLG w historii ewolucyjnej kręgowców pojawia się po raz pierwszy u ryb i pojawiła się jednocześnie z takimi strukturami jak rogówka oraz żuchwa. Brak jednoznacznych danych wskazujących czy są to zdarzenia wzajemnie zależne, czy jest to przypadkowe wystąpienie jednocześnie dwóch zjawisk (Yuan i wsp., 2018).

Wraz z wykształceniem się OLG, pojawiło się też MBP, które wykazuje cechy białka wewnątrznie nieuporządkowanego (IDP – *intrinsically disordered protein*), co uniemożliwia poznanie jego struktury. U kręgowców lądowych gen kodujący MBP ulega stopniowej ekspresji, zależnie od stadium rozwojowego. U człowieka, w rozwoju embrionalnym oraz po-reprodukcyjnym dominuje ekspresja izoformy Golli-MBP, obecnej nie tylko w OLG ale też w neuronach i limfocytach T. Od urodzenia do wieku średniego, dominuje ekspresja formy klasycznej MBP obecnej w osłonkach mielinowych. Obydwie formy ulegają ekspresji z tego samego locus, jednakże forma Golli transkryptu obejmuje sekwencje 5' locus, podczas gdy klasyczne MBP powstaje z dalszego 3' odcinka locus MBP (Siu i wsp., 2015).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że MBP nie pojawiło się jako jednorazowy wynik przekształcenia z genu kodującego inne białko. W porównaniu do sekwencji MBP u innych kręgowców, u Latimerii transkrypt MBP koduje to białko krótsze z C-końca. U Latimerii oraz pozostałych ryb kostnoszkieletowych nie wykazano istotnych różnic w strukturze osłonek mielinowych (Tohyama i wsp., 1999). Wyniki niniejszych badań należałoby uzupełnić o dane ultrastrukturalne.

W niniejszej dysertacji wykonano szereg analiz, które pozwalają postawić hipotezę, że u większości kręgowców gen kodujący dłuższą formę MBP jest wynikiem fuzji kolejnego fragmentu DNA do wcześniej funkcjonującego genu. U kręgowców lądowych, w tym również u człowieka i psa, obserwuje się taką samą organizację strukturalną MBP jak u *Dipnoi* i ryb chrzęstnoszkieletowych.

Gen *MOG* po raz pierwszy pojawia się u ssaków i wyewoluował najprawdopodobniej jako efekt rekombinacji jednego z genów kodujących białko z rodziny BTN: BTN1A1 (Afrache i wsp., 2012). Taką hipotezę wydaje się potwierdzać obserwacja, że przeciwciała przeciwko BTN mogą stanowić podłoże dla autoimmunizacji anty – MOG (Afrache i wsp., 2017). Specyficzna ekspresja MOG w mózgu, wykazana tylko u człowieka, może być wynikiem charakterystycznej budowy promotora genu.

Wyniki niniejszej dysertacji są dowodem, że promotor MOG naczelnych różni się miejscami wiązania TF, od sekwencji tego promotora u pozostałych ssaków w tym psów oraz opublikowanych danych dotyczących gryzoni (Solly i wsp., 1997; Jaquet i wsp., 1999). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że MOG jest „ewolucyjnie młodym” genem i powstał na skutek działania transpozonów. Udział transpozonów w ewolucji mózgu ssaków został dotychczas opisany w odniesieniu do genów regulujących neurogenezę i ekspansję kory nowej (*neocortex*). Ich udział uważany jest za jedną z głównych przyczyn, prowadzących do skokowych zmian w ewolucji układu nerwowego (Ferrari i wsp., 2021). Białko MOG oraz nowe sub-rodziny BTN pojawiły się ekspansywnie i równocześnie. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że zdarzenia te związane są ze wzmożoną aktywnością transpozonalną, kształtującą również układ rozrodczy u ssaków (Plianchaisuk i wsp., 2022).

Zawarte w OLG FT jako białko magazynujące żelazo są kluczowe dla utrzymania prawidłowego poziomu reakcji redoks. Czynniki chemiczne i fizyczne takie jak: hipoksja, promieniowanie UVB oraz zmiany pola magnetycznego, zaburzają równowagę potencjału redoks w komórkach i ich funkcjonowanie (Berner, 2006). Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie sugerują, że pojawianie się FT u wczesnych kręgowców było wynikiem działania tych warunków środowiskowych. Dodatkowo w niniejszych badaniach zaobserwowano zależność pojawienia się np. rogówki i zuchwy wraz z nowymi formami FT i OLG (Millholland i wsp., 1999)

W niniejszej pracy zaobserwowano korelację pomiędzy ilością izoform FT, a poziomem tlenu i dostępnością rozpuszczonego w wodzie $Fe^{2+}/3+$. Dotyczy to przede wszystkim wczesnego okresu rozwoju embrionalnego każdej grupy kręgowców. *Amniota* rozwinęły najszerszą pulę FT, prawdopodobnie w celu precyzyjnego regulowania równowagi reakcji redoks i poprawy asymilacji żelaza. Pojawienie się nowych wariantów FTHmito i FTHL17 w *Placentalia* zbiega się w czasie z tworzeniem łożyska i rozwojem płodu w płynie owodniowym. Natomiast zarodki gadów i ptaków mają utrudniony dostęp do żelaza, dlatego mogą prezentować zmniejszoną liczbę podrodzin FT, ale zróżnicowanych, jako odpowiedź na zwiększony stres redoks (Roels i wsp., 1996).-

Badania immunohistologiczne na poszczególnych etapach rozwoju embrionalnego przedstawicieli strunowców umożliwiłyby sprecyzowanie rozmieszczenia poszczególnych FT w tkankach i narządach. W niniejszej pracy poddane analizie białka: MBP, MOG, FT ich ewolucja oraz czynniki środowiskowe, które je kształtują zostały podsumowane na poniższym schemacie (Ryc 18)

VI. Wnioski

- Wykazano podobieństwo rozkładu i morfologii OLG pomiędzy psem a człowiekiem
- Nie wykazano istotnych różnic w analizach morfometrycznych OLG pomiędzy mężczyznami i kobietami, a także pomiędzy samcami i samicami psa, tym samym potwierdzając założenia pracy
- Zaproponowano sposób klasyfikacji białek z rodziny ferrytyn na podstawie potencjalnych zdolności katalitycznych i pochodzenia ewolucyjnego. Dotychczasowe klasyfikacje opierano głównie na względnej różnicy wielkości białka u poszczególnych gatunków
- Uzyskane wyniki pozwalają postawić hipotezę o pochodzeniu genu *MBP* jako fuzji dwóch niezależnych genów
- Wykazano możliwe przyczyny zróżnicowanej ekspresji białka MOG w różnych narządach u różnych grup ssaków – u człowieka tylko w OLG, natomiast również w innych tkankach u psa i innych grup ssaków
- Dokonano usystematyzowania wiedzy na temat czynników środowiskowych, wpływających na ewolucję białek funkcjonalnych OLG

VII Bibliografia

1. Afrache H, Gouret P, Ainouche S, Pontarotti P, Olive D. The butyrophilin (BTN) gene family: from milk fat to the regulation of the immune response. *Immunogenetics*. 2012 Nov;64(11):781-94
2. Afrache H, Pontarotti P, Abi-Rached L, Olive D. Evolutionary and polymorphism analyses reveal the central role of BTN3A2 in the concerted evolution of the BTN3 gene family. *Immunogenetics*. 2017 Jun;69(6):379-390.
3. Aggarwal, S. et al. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. *PLoS Biol*. 11, e1001577 (2013).
4. Ainani H, Bouchmaa N, Ben Mrid R, El Fatimy R. Liquid-liquid phase separation of protein tau: An emerging process in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Dis*. 2023 Mar;178:106011.
5. Allen TA, Fortin NJ. The evolution of episodic memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 18;110 Suppl 2(Suppl 2):10379-86
6. Altschul SF, Lipman DJ. 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5509– 13
7. Altschul SF, Lipman DJ. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5509
8. ana M, Ghosh S, Pahan K. Upregulation of Myelin Gene Expression by a Physically-Modified Saline via Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Activation of CREB: Implications for Multiple Sclerosis. *Neurochem Res*. 2018 Feb;43(2):407-419.
9. Andrews SC. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):691-705. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.05.010.
10. Baak J.P.A., Noteboom E., Koevoets J.J.M. 1989. The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. *Anal. Quant. Cytol. Histol*. 11, 219-224.
11. Baron W, Hoekstra D. 2010. On the biogenesis of myelin membranes: Sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett* 584: 1760–1770.
12. Baumann N, Pham-Dinh D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev*. 81, 871-927.
13. Ben Geren B. 1954. The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Exp Cell Res* 7: 558–562
14. Beniac DR, Wood DD, Palaniyar N, Ottensmeyer FP, Moscarello MA, Harauz G. Marburg's variant of multiple sclerosis correlates with a less compact structure of myelin basic protein. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999 Apr;1(1):48-51
15. Beniac, D. R. et al. Marburg's variant of multiple sclerosis correlates with a less compact structure of myelin basic protein. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun* 1, 48–51 (1999)
16. Berger T, Reindl M (2007). Multiple sclerosis: disease biomarkers as indicated by pathophysiology. *Journal of the Neurological Sciences*. 259 (1–2): 21–6.

17. Berger T., Frotscher M. 1994. Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J. Neurocytol.* 23, 61-74.
18. Bloom J.S., Hynd G.W. 2005. The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: excitation or inhibition? *Neuropsychology.* 15, 59-71.
19. Braak H On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigmentarchitectonic study *Cell Tissue Res* 1974;152(3):349-83.
20. Bradley BJ. Reconstructing phylogenies and phenotypes: a molecular view of human evolution. *J Anat.* 2008;212:337–353
21. Breithaupt C, Schubart A, Zander H, Skerra A, Huber R, Linington C, Jacob U (2003) Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9446–9451.
22. Brilot F, Dale RC, Selter RC, Grummel V, Kalluri SR, Aslam M, Busch V, Zhou D, Cepok S, Hemmer B (2009) Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease. *Ann Neurol* 66:833–842.
23. Brown, P. J., Johnson, P. M., Ogbimi, A. O., & Tappin, J. A. (1979). Characterization and localization of human placental ferritin. *Biochem. J.*, 182,763–769.
24. Bui T, M Das J. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Neuroanatomy, Cerebral Hemisphere*
25. Bunge RP. 1968. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48: 197–251.
26. Carvalho C, Gaspar A, Knight A, Vicente L. Ethical and Scientific Pitfalls Concerning Laboratory Research with Non-Human Primates, and Possible Solutions. *Animals (Basel).* 2018 Dec 29;9(1):12.
27. Cavallotti D., Cavallotti C., Pescosolido N., Iannetti G.D., Pacella E.2001 .A morphometric study of age changes in the rat optic nerve. *Ophthalmologica.* 215, 366-371.
28. Chen JJ, Flanagan EP, Jitprapaikulsan J, Lopez-Chiriboga ASS, Fryer JP, Leavitt JA, Weinshenker BG, McKeon A, Tillema JM, Lennon VA et al (2018) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-positive optic neuritis: clinical characteristics, radiologic clues, and outcome. *Am J Ophthalmol* 195:8–15.
29. Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, Zhao C, Shen YA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, et al. 2012. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc Natl Acad Sci* 109: 1299–1304.
30. Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MH. 2011. Lipid metabolism in myelinating glial cells: Lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res* 52: 419–434.
31. Clements CS, Reid HH, Beddoe T, Tynan FE, Perugini MA, Johns TG, Bernard CC, Rossjohn J (2003) The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11059–11064.

32. Coetzee T, Fujita N, Dupree J, Shi R, Blight A, Suzuki K, Popko B. 1996. Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: Normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 86: 209–219.
33. Connor J.R., Menzies S.L. 1995. Cellular management of iron in the brain. *J. Neurol. Sci.* 134, 33-44.
34. Czopka T, French-Constant C, Lyons DA. 2013. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev Cell* 25: 599–609.
35. D'Souza, C. A. & Moscarello, M. A. Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope. *Neurochem. Res.* 31, 1045–1054 (2006).
36. Dai X, Lercher LD, Clinton PM, Du Y, Livingston DL, Vieira C, Yang L, Shen MM, Dreyfus CF. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *J Neurosci.* 2003 Jul 2;23(13):5846-53.
37. del Río-Hortega P. 1921. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglia) [Glia with many processes (oligodendroglia)]. *Trab Lab Histol Patol* 1–15: 1–43.
38. Dombrowski S.M., Hilgetag C.C., Barbas H. 2001. Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cereb. Cortex.* 11, 975–988.
39. Dupouey, P. et al. Immunochemical studies of myelin basic protein in shiverer mouse devoid of major dense line of myelin. *Neurosci. Lett.* 12, 113–118 (1979).
40. Edgar JM, Nave K-A. 2009. The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr Opin Neurobiol* 19: 498–504.
41. El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D427-D432.
42. Ferrari R, Grandi N, Tramontano E, Dieci G. Retrotransposons as Drivers of Mammalian Brain Evolution. *Life (Basel).* 2021 Apr 22;11(5):376.
43. Finarelli JA, Flynn JJ. Brain-size evolution and sociality in Carnivora. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 9;106(23):9345-9.
44. Finlay BL, Darlington RB. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* 1995;268:1578–1584.
45. Franco NH. *Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective* Animals (Basel). 2013 Mar 19;3(1):238-73.
46. Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature.* 2012 Apr 29;485(7399):517-21.
47. Gazzaniga M.S. 2000. Cerebral specialization and interhemispheric communication: does the corpus callosum enable the human condition? *Brain.* 123, 1293–1326.

48. Gibson, E. M. et al. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344, 1252304 (2014).
49. Golgi, C. Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. *Gazz. Med. Ital. Lombardia* 6, 244–246 (1873).
50. Goodall J. *Through a Window: 30 Years Observing the Gombe Chimpanzees*. Weidenfeld and Nicolson; 1990
51. Gramling C 2016 A dinosaur's brain, preserved in a pebble <https://www.science.org/content/article/dinosaur-s-brain-preserved-pebble>
52. Grantham-McGregor S., Ani C. 2001. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J.Nutr.* 131, 649- 668.
53. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, et al. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280: 1610–1613.
54. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010 May;59(3):307-21.
55. Gundersen H.J.G., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbo L., Marcussen N., Møller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Sørensen F.B., Vesterby A., West M. J.1988. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96, 857-881.
56. Hagemeyer N, Goebbels S, Papiol S, Kästner A, Hofer S, Begemann M, Gerwig UC, Boretius S, Wieser GL, Ronnenberg A, et al. 2012. A myelin gene causative of a catatonia-depression syndrome upon aging. *EMBO Mol Med* 4: 528–539
57. Han H, Myllykoski M, Ruskamo S, Wang C, Kursula P. Myelin-specific proteins: a structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *Biofactors.* 2013 May-Jun;39(3):233-41.
58. Han, H., Myllykoski, M., Ruskamo, S., Wang, C. & Kursula, P. Myelin-specific proteins: A structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *Biofactors* 39, 233–241 (2013).
59. Hess MW, Kirschning E, Pfaller K, Debbage PL, Hohenberg H, Klima G. 1998. 5000-year-old myelin: Uniquely intact in molecular configuration and fine structure. *Curr Biol* 8: R512–R513.
60. Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C. 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40: 319–384
61. Hines JH. Evolutionary Origins of the Oligodendrocyte Cell Type and Adaptive Myelination. *Front Neurosci.* 2021 Dec 1;15:757360.
62. Hines, J. H., Ravanelli, A. M., Schwindt, R., Scott, E. K. & Appel, B. Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat. Neurosci.* 18, 683–689 (2015).

63. Ho NF , JM Hooker, A Sahay, DJ Holt, JL Roffman In Vivo Imaging of Adult Human Hippocampal Neurogenesis: Progress, Pitfalls and Promise *Mol Psychiatry*, 18: 404-416, 2013
64. Ishii A, Dutta R, Wark GM, Hwang SI, Han DK, Trapp BD, Pfeiffer SE, Bansal R. 2009. Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin. *Proc Natl Acad Sci* 106: 14605–14610.
65. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. 2009. Myelin proteomics: Molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* 40: 55–72.
66. Jaquet V, Pfend G, Tosic M, Matthieu JM. Analysis of cis-acting sequences from the myelin oligodendrocyte glycoprotein promoter. *J Neurochem*. 1999 Jul;73(1):120-8.
67. Jaquet V, Pfend G, Tosic M, Matthieu JM. Analysis of cis-acting sequences from the myelin oligodendrocyte glycoprotein promoter. *J Neurochem*. 1999 Jul;73(1):120-8.
68. Javed K, Reddy V, M Das J, Wroten M. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan, 2021. Neuroanatomy, Wernicke Area. 2020 Jul 31
69. Jin SW, Sim KB, Kim SD. Development and Growth of the Normal Cranial Vault : An Embryologic Review. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59(3):192–6
70. Kaas JH. Evolution of the neocortex. *Curr Biol*. 2006 Nov 7;16(21):R910-4
71. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2019 Jul 19;20(4):1160-1166.
72. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013 Apr;30(4):772-80
73. Kattinig, D. R., Bund, T., Boggs, J. M., Harauz, G. & Hinderberger, D. Lateral self-assembly of 18.5-kDa myelin basic protein (MBP) charge component-C1 on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1818, 2636–2647 (2012).
74. Kim MY, Jeong BC, Lee JH, Kee HJ, Kook H, Kim NS, Kim YH, Kim JK, Ahn KY, Kim KK. A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 29;103(35):13074-9
75. Kim, M., Rho, Y., Jin, K. S., Ahn, B., Jung, S., Kim, H., & Ree, M. (2011). pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: Disassembly and reassembly. *Biomacromolecules*, 12, 1629–1640
76. Knierim JJ The Hippocampus *Curr Biol*, 25: R1116-R1121, 2015
77. Knoll, W. et al. Structural and dynamical properties of reconstituted myelin sheaths in the presence of myelin proteins MBP and P2 studied by neutron scattering. *Soft Matter* 10, 519–529 (2014).
78. Korbo L. 1999. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 23, 164–168.
79. Lacaille JC, PA Schwartzkroin Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular Response Characteristics, Synaptic responses, and Morphology *J Neurosci*, 8: 1400-1410, 1988

80. Lahtinen Maria, David Clinnick, Kristiina Mannermaa, J. Sakari Salonen & Suvi Viranta Excess protein enabled dog domestication during severe Ice Age winters *Scientific Reports* volume 11, Article number: 7 (2021)
81. Lairmore MD, Khanna C Naturally occurring diseases in animals: contributions to translational medicine. *ILAR J.* 2014;55(1):1-3.
82. Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave K-A. 2003. Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33: 366–374.
83. Lee, D. W. et al. Adsorption mechanism of myelin basic protein on model substrates and its bridging interaction between the two surfaces. *Langmuir* 31, 3159–3166 (2015).
84. Lee, D. W. et al. Lipid domains control myelin basic protein adsorption and membrane interactions between model myelin lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E768–E775 (2014).
85. Lee, Y. et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448 (2012).
86. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W242-5.
87. LeVine S.M., Torres M.V. 1993. Satellite oligodendrocytes and myelin are displaced in the cortex of the reeler mouse. *Brain Res.* 75, 279-284.
88. Li, Y. et al. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *EMBO J.* 24, 2968–2979 (2005).
89. Lin S.C., Bergles D.E. 2004. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 7, 24-32.
90. Linder, M. C., Goode, C. A., Gonzalez, R., Gottschling, C., Gray, J., & Nagel, G. M. (1989). Heart tissue contains small and large aggregates of ferritin subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273, 34–41
91. Linder, M. C., Nagel, G. N., Roboz, M., & Hungerford, D. Jr. (1981). Heart cells contain a ferritin larger and more asymmetric than ferritins of other mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 256, 9104–9111.
92. Liow LH, Finarelli JA. A dynamic global equilibrium in carnivoran diversification over 20 million years. *Proc Biol Sci.* 2014 Jan 22;281(1778)
93. Löscher W. Dogs as a Natural Animal Model of Epilepsy. *Front Vet Sci.* 2022 Jun 22;9:928009
94. MacQuiddy B, Moreno JA, Kusick B, McGrath S. Assessment of risk factors in dogs with presumptive advanced canine cognitive dysfunction. *Front Vet Sci.* 2022 Oct 18;9:958488.
95. Manrique-Hoyos N, Jurgens T, Gronborg M, Kreutzfeldt M, Schedensack M, Kuhlmann T, Schrick C, Bruck W, Urlaub H, Simons M, et al. 2012. Late motor decline after accomplished remyelination: Impact for progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 71: 227–244

96. Mazher KM, RM Hassan Histological, Histochemical, and Immunohistochemical Studies of Hippocampus in Male New Zealand rabbits Anat Rec (Hoboken), 304: 393-399, 2021
97. McDougall, S. et al. Myelination of axons corresponds with faster transmission speed in the prefrontal cortex of developing male rats. *eneuro* 5, <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0203-18.2018> (2018).
98. Mehta RI, Schneider JA. Neuropathology of the Common Forms of Dementia. *Clin Geriatr Med.* 2023 Feb;39(1):91-107
99. Mercer A, AM Thomson Cornu Ammonis Regions-Antecedents of Cortical Layers?
100. Micheva, K. D. et al. A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife* 5, e15784 (2016).
101. Millholland JM, Fitch JM, Cai CX, Gibney EP, Beazley KE, Linsenmayer TF. Ferritoid, a tissue-specific nuclear transport protein for ferritin in corneal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):23963-70.
102. Moran CJ, Ramesh A, Brama PA, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop.* 2016 Dec;3(1):1.
103. Müller RT, Ferreira JD, Pretto FA, Bronzati M, Kerber L. The endocranial anatomy of *Buriolestes schultzi* (Dinosauria: Saurischia) and the early evolution of brain tissues in sauropodomorph dinosaurs. *J Anat.* 2021 Apr;238(4):809-827
104. Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics *Science.* 2001 Dec 14;294(5550):2348-51.
105. Murtie J.C., Macklin W.B., Corfas G. 2007. Morphometric analysis of oligodendrocytes in the adult mouse frontal cortex. *J. Neurosci. Res.*, 85, 2080–2086.
106. Musiek FE. Neuroanatomy, neurophysiology, and central auditory assessment. Part III: Corpus callosum and efferent pathways. *Ear Hear.* 1986 Dec;7(6):349-58
107. Nardone R, Höller Y, Taylor AC, Lochner P, Tezzon F, Golaszewski S, Brigo F, Trinka E. Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology (Jena).* 2016 Feb;119(1):64-73
108. Nave K-A. 2010. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11: 275–283.
109. Nave, K.-A. & Ehrenreich, H. Myelination and oligodendrocyte functions in psychiatric diseases. *JAMA Psychiatry* 71, 582–584 (2014)
110. Nawaz S, Schweitzer J, Jahn O, Werner HB. Molecular evolution of myelin basic protein, an abundant structural myelin component. *Glia.* 2013 Aug;61(8):1364-77.
111. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015 Jan;32(1):268-74.
112. Nishikuni K, Ribas GC. Study of fetal and postnatal morphological development of the brain sulci. *J Neurosurg Pediatr.* 2013;11(1):1–11

113. Nissl, F. 1894. Über die sogenannten Granula der Nervenzellen. *Neurologisches Centralblatt*. Leipzig. 13, 676-685
114. Nyakatura K, Bininda-Emonds OR. Updating the evolutionary history of Carnivora (Mammalia): a new species-level supertree complete with divergence time estimates. *BMC Biol*. 2012 Feb 27;10:12.
115. Ogawa Y., Okado N., Kojima T. 1975. A new technique of silver impregnation for oligodendrocytes with potassium dicyanoargentate by means of perfusion-fixation method. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 52, 39-50.
116. Partridge B, Rossmeis JH Jr. Companion animal models of neurological disease. *J Neurosci Methods*. 2020 Feb 1;331:108484.
117. Penfield W. 1924. Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia. *Brain* 47: 430–452.
118. Peters A. 2009. The effect of normal aging on myelinated nerve fibres in monkey central nervous system. *Frontier Neuroanat.* 3, 1-10.
119. Peters D.G., Connor J.R. 2014. Introduction to cells comprising the nervous system. *Adv. Neurobiol.* 9, 33-45.
120. Peters, A. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Front. Neuroanat.* 3, 11 (2009).
121. Peters, A., Sethares, C. & Killiany, R. J. Effects of age on the thickness of myelin sheaths in monkey primary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 435, 241–248 (2001)
122. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3: 191–197.
123. Pham-Dinh D, Della Gaspera B, Kerlero de Rosbo N, Dautigny A (1995a). Structure of the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene and multiple alternative spliced isoforms. *Genomics.* 29 (2): 345–52
124. Pham-Dinh D, Jones EP, Pitiot G, Della Gaspera B, Daubas P, Mallet J, Le Paslier D, Fischer Lindahl K, Dautigny A (1995b). Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region. *Immunogenetics.* 42 (5): 386–91
125. Plianchaisuk A, Kusama K, Kato K, Sriswasdi S, Tamura K, Iwasaki W. Origination of LTR Retroelement-Derived NYNRIN Coincides with Therian Placental Emergence *Mol Biol Evol.* 2022 Sep 1;39(9):msac176.
126. Pritzker, L., Joshi, S., Gowan, J., Harauz, G. & Moscarello, M. Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D. *Biochemistry* 39, 5374–5381 (2000)
127. Privat, A., Jacque, C., Bourre, J., Dupouey, P. & Baumann, N. Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse shiverer. *Neurosci. Lett.* 12, 107–112 (1979).
128. Pujato M, Kieken F, Skiles AA, Tapinos N, Fiser A Prediction of DNA binding motifs from 3D models of transcription factors; identifying TLX3 regulated genes. *Nucleic Acids Res* (2014) 42(22) : 13500-12
129. Ramón y Cajal, Santiago. *Manual de Histología normal y Técnica micrográfica*. Valencia : Librería de Pascual Aguilar, 1889

- 130.Reinert, A., Morawski, M., Seeger, J., Arendt, T., & Reinert, T. (2019).Iron concentrations in neurons and glial cells with estimates on ferritin concentrations. *BMC Neurosci.*, 20, 25.
- 131.Reyes LD, Sherwood CC. Neuroscience and Human Brain Evolution. In: Bruner E, editor. *Human Paleoneurology*. Springer; 2015. pp. 11–37.
- 132.Ribas GC. The cerebral sulci and gyri. *Neurosurg Focus*. 2010;28(2):E2.
- 133.Roels S, Ducatelle R, Cornelissen H. Quantitative image analysis as an alternative to chemical analysis for follow-up of liver biopsies from a toucan with hemochromatosis. A technique with potential value for the follow-up of hemochromatosis in humans. *Anal Quant Cytol Histol*. 1996 Jun;18(3):221-4.
- 134.Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012 May;61(3):539-42.
- 135.Rosato-Siri MV, Adami PVM, Guitart ME, Verstraeten S, Morelli L, Correale J, Pasquini JM. Glial Cell Metabolic Profile Upon Iron Deficiency: Oligodendroglial and Astroglial Casualties of Bioenergetic Adjustments.*Mol Neurobiol*. 2023 Jan 3.
- 136.Rosenbluth J. 1999. A brief history of myelinated nerve fibers: One hundred and fifty years of controversy. *J Neurocytol* 28: 251–262.
- 137.Roth AD, Ivanova A, Colman DR. 2006. New observations on the compact myelin proteome. *Neuron Glia Biol* 2: 15–21.
- 138.Roth MP, Malfroy L, Offer C, Sevin J, Enault G, Borot N, Pontarotti P, Coppin H (1995). The human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene: complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics*. 28 (2): 241–50.
- 139.Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. 2008. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* 56: 1532–1540.
- 140.Sánchez-Abarca L.I., Tabernero A., Medina J.M. 2001. Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia*. 36, 321-329.
- 141.Sanyal, B., Polak, P. E., & Szuchet, S. (1996). Differential expression of the heavy-chain ferritin gene in non-adhered and adhered oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 46, 187–197
- 142.Sayers EW, Beck J, Brister JR, Bolton EE, et al. 2020. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids res* 48:D9-16.
- 143.Schulte E, Arlt SP. What Kinds of Dogs Are Used in Clinical and Experimental Research? *Animals (Basel)*. 2022 Jun 8;12(12):1487.
- 144.Seidl, A. H. & Rubel, E. W. Systematic and differential myelination of axon collaterals in the mammalian auditory brainstem. *Glia* 64, 487–494 (2016).
- 145.Seidl, A. H., Rubel, E. W. & Barría, A. Differential conduction velocity regulation in ipsilateral and contralateral collaterals innervating brainstem coincidence detector neurons. *J. Neurosci*. 34, 4914–4919 (2014).
- 146.Shaharabani, R. et al. Structural transition in myelin membrane as initiator of multiple sclerosis. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 12159–12165 (2016).
- 147.Shen W, Pristov JB, Nobili P, Nikolić L.Can glial cells save neurons in epilepsy? *Neural Regen Res*. 2023 Jul;18(7):1417-1422

148. Sherwood CC, Subiaul F, Zawidzki TW. A natural history of the human mind: tracing evolutionary changes in brain and cognition. *J Anat.* 2008;212:426–454
149. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jun 22;8(1):a020479.
150. Simpson I.A., Ponnuru P., Klinger M.E., Myers R.L., Devraj K., Coe C.L., Lubach G.R., Carruthers A., Connor J.R. 2015. A novel model for brain iron uptake: introducing the concept of regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 48-57.
151. Siu CR, Balsor JL, Jones DG, Murphy KM. Classic and Golli Myelin Basic Protein have distinct developmental trajectories in human visual cortex. *Front Neurosci.* 2015 Apr 24;9:138
152. Solly SK, Daubas P, Monge M, Dautigny A, Zalc B. Functional analysis of the mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene promoter in the oligodendroglial CG4 cell line. *J Neurochem.* 1997 Apr;68(4):1705-11.
153. Solly SK, Daubas P, Monge M, Dautigny A, Zalc B. Functional analysis of the mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene promoter in the oligodendroglial CG4 cell line. *J Neurochem.* 1997 Apr;68(4):1705-11.
154. Somjen GG. 1988. *Nervenkitt: Notes on the history of the concept of neuroglia.* *Glia* 1: 2–9.
155. Stange-Marten, A. et al. Input timing for spatial processing is precisely tuned via constant synaptic delays and myelination patterns in the auditory brainstem. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, E4851–E4858 (2017).
156. Stedehouder, J. et al. Fast-spiking parvalbumin interneurons are frequently myelinated in the cerebral cortex of mice and humans. *Cereb. Cortex* 27, 5001–5013 (2017).
157. Stedehouder, J., Brizee, D., Shpak, G. & Kushner, S. A. Activity-dependent myelination of parvalbumin interneurons mediated by axonal morphological plasticity. *J. Neurosci.* 38, 3631–3642 (2018).
158. Suresh, S., Wang, C., Nanekar, R., Kursula, P. & Edwardson, J. M. Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers. *Biochemistry* 49, 3456–3463 (2010)
159. Tanaka-Arakawa MM, Matsui M, Tanaka C, Uematsu A, Uda S, Miura K, Sakai T, Noguchi K. Developmental changes in the corpus callosum from infancy to early adulthood: a structural magnetic resonance imaging study. *PLoS One.* 2015 Mar 19;10(3):e0118760. doi: 10.1371/journal.pone.0118760. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(7):e0133090. PMID: 25790124; PMCID: PMC4366394.
160. Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Front Neurol Neurosci.* 2014;34:18-25.
161. Ten Donkelaar HJ, N Tzourio-Mazoyer, JK Mai Toward a Common Terminology for the Gyri and Sulci of the Human Cerebral Cortex *Front Neuroanat*, 12: 2018
162. Todorich, B., Zhang, X., & Connor, J. R. (2011). H-ferritin is the major source of iron for oligodendrocytes. *Glia*, 59, 927–935.
163. Tohyama Y, Kasama-Yoshida H, Sakuma M, Kobayashi Y, Cao Y, Hasegawa M, Kojima H, Tamai Y, Tanokura M, Kurihara T. Gene structure and amino acid sequence

- of *Latimeria chalumnae* (coelacanth) myelin DM20: phylogenetic relation of the fish. *Neurochem Res.* 1999 Jul;24(7):867-73.
164. Tomassy, G. S. et al. Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 344, 319–324 (2014).
165. Tzourio-Mazoyer N. Intra- and Inter-hemispheric Connectivity Supporting Hemispheric Specialization. In: Kennedy H, Van Essen DC, Christen Y, editors. *Micro-, Meso- and Macro-Connectomics of the Brain* [Internet]. Springer; Cham (CH): Mar 11, 2016. pp. 129–146
166. Uddin MA, Haq TU, Rafique MZ. Cerebral venous system anatomy. *J Pak Med Assoc.* 2006;56(11):516–9
167. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, Macleod MR. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 2010 Mar 30;7(3):e1000245.
168. Vassall, K. A., Bamm, V. V. & Harauz, G. MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. *Biochem. J.* 472, 17–32 (2015).
169. Vassall, K. A., Jenkins, A. D., Bamm, V. V. & Harauz, G. Thermodynamic analysis of the disorder-to-alpha-helical transition of 18.5-kDa myelin basic protein reveals an equilibrium intermediate representing the most compact conformation. *J. Mol. Biol.* 427, 1977–1992 (2015).
170. Vaughan D.W., Peters A. 1974. Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *J. Neurocytol.* 3, 405-409.
171. Vinet J, Lemieux P, Tamburri A, Tiesinga P, Scafidi J, Gallo V, Sík A. 2010. Subclasses of populate the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 31, 425-438.
172. Visanji N.P., Collingwood J.F., Finnegan M.E., Tandon A., House E., Hazrati L.N. 2013. Iron deficiency in parkinsonism: region-specific iron dysregulation in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J. Parkinsons Dis.* 3, 523-537.
173. Vulimiri, L., Linder, M. C., Munro, H. N., & Catsimpoilas, N. (1977). Structural features of rat cardiac ferritins. *Biochim. Biophys. Acta*, 491, 67–75
174. Wawrzyniak A, Balawender K, Lalak R, Golan MP, Wróbel K, Boroń D, Staszkiwicz R, Grabarek BO. Distribution and Morphological Characteristics of Oligodendrocytes in Selected Areas of the Brain of Male and Female Red Kangaroos (*Macropus rufus*). *Animals (Basel)*. 2022a Jul 31;12(15):1946.
175. Wawrzyniak A, Balawender K, Lalak R, Staszkiwicz R, Boroń D, Grabarek BO. Oligodendrocytes in the periaqueductal gray matter and the corpus callosum in adult male and female domestic sheep. *Brain Res.* 2022b Oct 1;1792:148036.
176. Wen, X., & Paine, M. L. (2013). Iron deposition and ferritin heavy chain (Fth) localization in rodent teeth. *BMC Res. Notes*, 6, 1
177. Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Mobius W, et al. 2007. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 27: 7717–7730.
178. West M.J. 1999. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22, 51–61.

179. Wilczyńska K, K Simonienko, B Konarzewska, SD Szajda, N1 Waszkiewicz
Morphological changes of the brain in mood disorders. *Zmiany morfologiczne mózgow zaburzeniach nastroju Psychiatr Pol*, 52: 797-805, 2018
180. Woodhams P.L., Basco E., Hajos F., Csillag A., Balazs R. 1981. Radial glia in the developing mouse cerebral cortex and hippocampus. *Anat. Embryol.* 163, 331-343.
181. Yuan T, York JR, McCauley DW. Gliogenesis in lampreys shares gene regulatory interactions with oligodendrocyte development in jawed vertebrates. *Dev Biol.* 2018 Sep 1;441(1):176-190.
182. Zhao Y.Y., Shi X.Y., Qiu X., Zhang L., Lu W., Yang S., Li C., Cheng G.H., Yang Z.W., Tang Y. 2011. Enriched environment increases the total number of CNPase positive cells in the corpus callosum of middle-aged rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 71, 322-30.
183. Zoller I, Meixner M, Hartmann D, Bussow H, Meyer R, Gieselmann V, Eckhardt M. 2008. Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J Neurosci* 28: 9741–9754.