

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р ЕКАТЕРИНА БОЯНОВА СОФТОВА-ЗЛАТАРОВА, д.м. ,

специалност „Патоанатомия и цитопатология“; МЦ „Сити Лаб“ ЕООД- Варна

ОТНОСНО: Защита на дисертационен труд на д-р Виктория Детелинова Михайлова, докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ към „Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ при МУ- Варна, за присъждане на образователната и научна степен **„ДОКТОР“** в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, Професионална направление 7.1. Медицина, Научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“

НА ТЕМА: „Промени в глиални популации на човешки теленцефалон след исхемична увреда“

Научен ръководител: доц. д-р Ирина И.Стоянова-ван дер Лаан, д.м.

Съгласно заповед № Р-109-172/27.05.2024 г. на Ректора на Медицински университет-Варна проф. д-р Димитър Райков, дмн, предвид доклад с вх.№ 102-1243/08.05.2024 г. от доц. д-р Д.Дженков, д.м., р-л Катедра по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ и с решение на ФС по протокол № 21/16.05.2024 г. и доклад с вх.№ 103-2570/21.05.2024 г- от проф. д-р Йото Йотов, дмн, Декан на Факултет „Медицина“ в МУ-Варна, съм избрана за външен член на НЖ, а на основание Протокол № 1 /29.05.2024 г. съм определена за официален рецензент по процедура за придобиване на ОНС **„ДОКТОР“** с кандидат д-р Виктория Детелинова Михайлова в Медицински Университет- Варна.

Като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ д-р Виктория Михайлова е зачислена със заповед № Р-109-52/15.01.2018 г. от Ректора на МУ-Варна, а с доклад за отчисляване, вх.№ 102-343/30.01.2023 г. от Ръководителя на Катедрата проф. М. Цанева, д.м., и със заповед на Ректора № Р-109-180/01.03.2023 г. д-р Михайлова е отчислена с право на защита. Дисертантката е положила успешно изпити за докторантски минимум /на 28.09.2020г./ и по чужд език/на 21.01.2021 г./. За конкурса тя е представила на хартиен и електронен носител комплект от материали, включващи необходимите документи в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и ПРАС в МУ- Варна.

Кратки биографични данни и кариерно развитие на докторантката. Д-р Виктория Детелинова Михайлова е родена на 22.10.1991г. в гр. Добрич. Завършва средното си образование през м. 09.2010 г. в Езикова гимназия „Гео Милев“-Добрич с преподаване на френски и английски език, като владее съответните чужди езици на ниво В2. През същата 2010 година е приета за студентка в МУ-Варна, където през 2016 г. завършва висшето си образование с образователно-квалификационна степен „магистър“ по специалността

„Медицина“ с професионална квалификация „лекар“/ протокол № 643/08.09.2016 г. и диплома за висше образование рег. № 004338/11.11.2016 г., серия МУВ 002958/. За кратки периоди – от 07.2014 - 01.2015 г. и от 08.2015-06.2016 г- д-р Михайлова работи като оператор за работа с клиенти в Concentrix – Варна с френски и английски език за обслужване на клиенти в Център за обаждания. За времето от 03.10-2016 г. до 20.02.2017 г. д-р Михайлова е назначена като лекар в Отделение по „Обща и клинична патология“ при МБАЛ „Св. Анна“ – Варна, а от м. октомври 2016 г. до 09.2018 г. е назначена за хонорован асистент в „Катедра по анатомия, хистология и ембриология“ при МУ-Варна. От 06.2017 г. до 09.2017 г. д-р Михайлова работи като лекар в Център за спешна медицинска помощ-Варна, а от 20.02.2017 г до 31.12.2020 г. работи като специализант по Обща и клинична патология в съотв. отделение на МБАЛ „Св. Анна“- Варна. От 10.2018 г. до настоящия момент е асистентка в „Катедрата по анатомия и клетъчна биология“ при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна и докторант по специалността „Патологоанатомия и цитопатология“ към „Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ в МУ- Варна. От януари 2021 г. работи като патолог в Клиника по „Обща и клинична патология“ на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна. След успешно положен държавен изпит, от 01.06.2021 г. д-р Михайлова има призната специалност по „Обща и клинична патология“/свидетелство с рег.№ 024875/01.07.2021 г., серия МУВ 2021 № 4620/.

Д-р Михайлова притежава много добра дигитална компетентност, отнасяща се до обработка на информация, комуникации, създаване на съдържание, сигурност и самостоятелно решаване на проблеми. Дисертантката владее свободно офис-пакет / програма за обработка на текст, електронна таблица, програма за презентации/; има свидетелство за управление на МПС клас В; член е на БДП, на БАД и на БЛС. Д-р Михайлова има 8 години преподавателски стаж като асистент в Катедрата по анатомия, като участва активно в учебната дейност с провеждане на практически занятия по БЕО и ЧЕО на студенти по медицина, вкл. и в провеждане на лекции в СИД по невробиология. Като лекар-асистент д-р Михайлова участва в диагностичната биопсична и аутопсионна дейност в Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св.Марина“- Варна, като прилага в ежедневната си практика не само стандартни рутинни, но и някои от високоспециализираните, най-вече ИХХ- методи на изследване. Професионалните и научни интереси на дисертантката са предимно в областта на невропатологията, като има определен интерес и към гинекологичната патология. Д-р Михайлова е участвала с научни доклади в 2 национални научни конференции, и в 4 научни прояви с международно участие у нас. Била е член в изследователски екип при разработката на 2 проекта по фонд „Наука“ при МУ- Варна, съотв. на тема: 1.“Постисхемична невропротекция: роля на грелина и транскрипционния фактор Рах6 /вх.№ ДН13/10 от 2017 г./, Фонд „НИ“- национален проект, и 2.“Астроцитна хетерогенност и експресия на транскрипционен фактор ZBTB20 в глиални субпопулации на човешки теленцефалон“, Фонд „Наука“ на МУ-Варна, конкурсна сесия 2019 г.

Актуалност и значимост на темата. Известно е, че глиалните клетки в ЦНС играят изключително важна роля, имаща отношение към осигуряване и поддържане на

хомеостазата в мозъчната тъкан при нормални физиологични условия и в случаите на тъканна увреда с различна етиология. Понастоящем в литературата има множество доказателства, отнасящи се до възможностите на тези клетки да проявяват в случаите на мозъчна увреда възпалителен и противовъзпалителен ефект. Важен момент от дейността на глиалните клетки е способността им да модулират процеси, свързани с неврогенезата, диференциацията на неврони и миграцията им във вече изградени, налични невронални вериги в мозъка на възрастни индивиди. Наред с наличния потенциал за пролиферация, тези клетки подпомагат отграничаването на засегнатия участък, възстановяването на неврони и регенерацията на синапси. Важно е да се отбележи фактът, че съществуващите в настоящия момент възможности за разкриване на нови молекули и сигнални пътища могат да допринесат за разработването на стратегии, подпомагащи и стимулиращи генерирането на нови, функционални неврони, като едновременно с това биха допринесли за повлияване и овладяване на развитото се мозъчно увреждане. Обикновено исхемичната мозъчна увреда /ИМУ/ се развива в случаи на понижена, или прекъсната доставка на кръв към определени участъци от мозъка. Доказано е, че в процеса на исхемия, с оглед ограничаване на увредената тъкан се активират специфични гени, участващи в процесите на адаптация и клетъчен отговор. Това от своя страна налага извода, че съществува възможност морфологичната трансформация в глиалните клетки и стимулирането на генната експресия при ИМУ да послужат като основа за разработване на нови терапевтични стратегии, целящи подобряване на клетъчния отговор при исхемия. В данни от литературата се посочва, че изучаването на глиалните клетки и възникващите сложни взаимоотношения в ЦНС са осъществявани предимно в условията на експеримент върху различни животински видове- гризачи и др. Използването на тези модели при развита се ИМУ дава възможности от една страна за контрол, отнасящ се до проследяване на мозъчната функция и промяната в основните механизми на заболяването, а от друга- за оценка, прогноза и прилагане на адекватна терапия.

Дисертационният труд на д-р Михайлова, посветен на изучаването на „промените в глиални популации на човешни теленцефалон след исхемична увреда“ е резултат от задълбочени и системни морфологични проучвания и изследвания на изключително актуален и с все по-нарастващо социално значение проблем, създаващ понякога затруднения, изискващи прецизно клинично-морфологична разпознаване с оглед поставяне на точна диагноза и провеждане на адекватно лечение. Литературни данни сочат, че на всеки 6 секунди някъде по света умира човек от мозъчен инфаркт, като България се нарежда на едно от първите места по смъртност от МИ, която е 270,1 при мъже и 265,1 при жени на 100 000 души население. Годишно у нас са регистрирани 82 398 заболявания, от които 35 311 на МИ, с летален край при 7 175 от засегнатите индивиди. Отчетено е, че преживели инфаркта са 28 136 засегнати, като 10% от тях са с развита се тежка инвалидност, а 25-50% са с изразени говорно-речеви нарушения. Въпреки постигнатите успехи в изясняването на някои от проявите на ИМУ, все още съществуват недостатъчно проучени въпроси и редица трудности, породени от голямата клетъчна хетерогенност и комбинации

от морфологични находки при това „жестоко“ мозъчно увреждане. Изложеното дотук дава основание да бъдат разширени проучванията и насочено да се търсят нови молекули и механизми, вкл. такива за активиране на транскрипционни фактори и сигнални пътища, които да бъдат „от полза“ и с възможности за изграждане и приложение на нови терапевтични стратегии при лечение. В настоящето изследване използваният достатъчен по обем материал, умело подобрите морфологични характеристики и прилагането на адекватни ИХХ- методи са дали възможност на д-р Михайлова за определяне на критерии и извеждане на изводи, отнасящи се до прогнозиране в развитието на болестния процес.

От обзора на литературата, който е написан на добър, литературно издържан български език, проличава много добрата осведоменост на д-р Михайлова по отн. описаните в световната наука постижения, касаещи структурата, функцията, генетичния профил и др. на хетерогенни популации от мозъчни клетки. Това ѝ дава възможност за изграждане на правилна оценка на въпроси, отнасящи се до проблеми, свързани с морфологията, ИХХ- и молекулярно-генетичния профил на различни клетъчни популации в норма и при въздействие на фактори от околната и вътрешната среда. Представените в обзора данни недвусмислено отразяват умението на д-р Михайлова не само да излага отразената в научната литература информация, но и да интерпретира, дискутира и съпоставя резултатите от различни проучвания в световен мащаб. В заключението към обзора д-р Михайлова поставя акцент върху налагащата се необходимост от провеждане на бъдещи допълнителни задълбочени проучвания с цел по-обстойно изясняване на пунктове от развиващите се взаимодействия между ИХХ- маркери и някои клинично-морфологични параметри при евентуална прогресия в хода на ИМУ.

В контекста на изложеното дотук, д-р Михайлова е ориентирала своите интереси към научно дирене, свързано с експресията на маркера ZBTB20 – самостоятелно и в комбинация с други маркери, с оглед оценка на ролята и значението му при избор на поведение при случаите с МИ. Умело подобрите от д-р Михайлова морфологични характеристики и прилагането на адекватни ИХХ-методи са ѝ дали възможност за определяне на критерии и извеждане на изводи с оглед превенция и прогнозиране на вероятността от прогресия в развитието на мозъчната увреда. В обзора обстойно са представени етиологичните и рискови фактори, благоприятстващи развитието на ИМУ, обединени в две основни групи: 1. Фактори от околната среда- тютюнопушене, алкохол и др., увреждания на кръвоносните съдове, като първо място е отредено на атеросклерозата с прояви на МСБ и тромб/емболични усложнения, артериити с различна генеза, мастна и туморна емболия и др. и 2. Генетични фактори.

Структура и анализ на дисертационния труд. Дисертационният труд на д-р Михайлова е правилно структуриран, написан с много добър, издържан научен стил и терминология. Трудът обхваща 158 стандартни машинописни страници и е онагледен с 49 фигури и 6 таблици, от които: 4 фигури и 2 таблици- в литературния обзор; 1 фигура и 4 таблици в

раздел „Материал и методи“; 40 фигури в раздел „Резултати“ и 4 фигури в „Обсъждане“. Разпределението на страниците по раздели е както следва: титулна страница, съдържание и използвани съкращения- 6 стр.; увод- 2 стр.; литературен обзор- 40 стр; цел и задачи- 1 стр.; материал и методи- 9 стр.; резултати – 46 стр. и обсъждане 16 стр; изводи- 1 стр; приноси- 1 стр; списък с публикации и участия в научни форуми- 2 стр; библиография- 31 стр.; включваща общо 358 заглавия, всички на латиница; заключение- 1 стр. От литературните източници прикл. 53% са публикувани през последните 10 год. Към дисертационния труд са приложени 3 публикации в пълен текст, публикувани в наши списания, и свързани с темата на дисертационния труд.

Оценка на литературния обзор. Литературният обзор е структуриран в раздели, отнасящи се до: 1. Произход на макроглиалните клетки; 2. Произход и роля на други клетъчни типове върху постнаталното развитие на мозъка; 3. Морфологична и функционална характеристика на астроцитите, вкл. тяхната хетерогенност, ИХХ- профил, генетичен анализ и междувидова хетерогенност при този клетъчен вид; 4. Морфологична и функционална характеристика на олигодендроцитите, вкл. описание на използваните маркери за идентифицирането им; транскрипционни фактори; 5. NG2- глия- вид на популацията- хомогенна или хетерогенна, и междувидова хетерогенност при този вид глия; 6. Морфология, функция и молекулярна хетерогенност на микроглията; 7. Ишемична мозъчна увреда- клинично значение, форми на исхемията, етиология, патогенеза и морфология на промените; роля на микроглията при ишемичната мозъчна увреда и влияние на други фактори след ИМУ; 8. Роля на ТФ SOX10, SOX9 и ZBTB20 при ИМУ, които като регулатори в процесите на клетъчна пролиферация и диференциация по време на ембрионалното развитие, и при клетъчна трансформация в мозъка на възрастни, развиваща се при физиологични условия и при ИМУ, имат пряко отношение към настоящия експеримент и са представени за първи път в контекста на ИМУ при човек.

Изложението на литературния обзор д-р Михайлова започва с цитиране на издиганото в продължение на дълги години в „догма“ от основоположниците на невропатологията твърдение, че мозъчната тъкан /неврони и глия / не притежава регенераторен потенциал, поради което структурата на мозъка при възрастни бозайници не се променя през целия им жизнен път, а броят на участващите в изграждането на мозъка клетъчни елементи остава непроменен. Постепенно, „стъпка по стъпка“ д-р Михайлова стига до наложилата се в последните десетилетия хипотеза за това, че зрялата мозъчна тъкан притежава пластични свойства, а клетъчният ѝ състав търпи динамични промени при физиологични и патологични условия. Понастоящем е известно, че в различни мозъчни региони при възрастни индивиди се формират нови неврони и глиални клетки с произход от клетки- „предшественици“, като този процес продължава през целия живот на индивида.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ: Целта на дисертационния труд е „ Да се изследва експресията на ZBTB20- маркера в глиалните клетки на човешки краен мозък и да се установи ефектът на ишемичната мозъчна увреда върху експресията на ZBTB20“. Тя е точно и ясно

формулирана, конкретна и адекватна на дисертационната тема, а **произтичащите от нея 8 задачи**, отнасящи се до: 1.Преданалитична подготовка на материалите- подбор на некропсични блокчета от мозъчна тъкан на починали пациенти без данни за неврологично заболяване, и от починали с данни за мозъчен инсулт; 2. Изработване на микроскопски срези от подбрани парафинови блокчета и прилагане на ИХХ-оцветявания/ пероксидазна и имунофлуоресцентна хистохимия/; 3. Сканиране на микроскопските препарати и анализ на получените дигитални изображения; 4.Определяне количеството, локализацията, разпределението и фенотипа на клетките, експресиращи ТФ ZBTB20 в човешки мозъчни тъкани без и с исхемична увреда; 5.Определяне на фракцията ZBTB20 +/- клетки от общия брой клетки в изследваните срези; 6.Сравнителен количествен анализ на експресията на ZBTB20 в мозъчни тъкани без исх. увреда и в постисхемични мозъчни тъкани; 7.Отчитане влиянието на специфични параметри върху експресията на ZBTB20 в постисхемични мозъчни тъкани; 8.Статистически анализ на получените данни, **са правилно конструирани, изпълними, и представляват логично продължение на обзора.**

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ. За целите на дисертационния труд е използван достатъчен по обем материал, необходим за статистическа обработка на данните и определяне на тяхната достоверност. Всички експериментални процедури са извършени след одобрение и в съответствие с правилата на КЕНИ към МУ-Варна с протокол/решение №115/ 31.03.2022г. Обект на изследването са мозъчни тъкани, събрани по време на аутопсия от починали хоспитализирани пациенти в „Клиника по обща и клинична патология“ при УМБАЛ „Св.Марина“- Варна. Като бази за реализация на дисертационния труд са ползвани „Клиниката и Катедрата по обща и клинична патология“ при УМБАЛ „Св.Марина“ и „Катедрата по анатомия и клетъчна биология“ при МУ-Варна. За получаване на информация касаеща пол, възраст, пост-мортал интервал/до 24 часа/, клинична симптоматика, придружаващи заболявания, образни изследвания и причина за смърт, е използвана медицинската документация на пациентите, а от аутопсионните протоколи са взети данни, отнасящи се до развилите се исхемични лезии- макроскопски вид, локализация, размер, засегнатата територия на кръвоснабдяване и др. Ретроспективно са подбрани случаи за период от 2 години, а именно: 12 случая без образни и хистологични данни за мозъчна увреда / контроли/ и 12 случая с клинични и образни данни за прекаран мозъчен инфаркт /МИ/. Във всяка от групите са включвани пациенти от двата пола - съотв. 9 мъже и 3 жени от контролната група и 7 мъже и 5 жени с мозъчна увреда; възрастта на пациентите е била между 45-83 г. /средна възраст при всяка отделна група- 68 г. /. Мозъчната тъкан, взета за изследване от пациенти от контролната група е от областта на моторната крайномозъчна кора /gyrus precentralis/, с включено СМВ и прилежащо БМВ /виж табл. 4.1./. В експерименталната група / с МИ/ локализацията на лезиите е била в две зони-перивентрикуларно, и в областта на крайномозъчната кора, при отделни случаи със засягане на СМВ и БМВ. Локализацията на лезиите е представена на много добре структурирана, информативна фигура /4.1./ Анализирани са общо 6 случая с МИ в област от крайномозъчната кора и 6 случая с перивентрикуларна локализация. Според давността на

ишемичното увреждане са формирани 3 групи: 1. Първа група- 1 пациент в остър стадий на исхемия; 2.Втора група- стадий на организация, подразделен на остра фаза /с 2/ и хронична фаза /със 7 /пациенти; 3.Трета група- стадий на резорбция /2 пациенти /. В табл. 4.2. е представена информация за случаите с ишемична мозъчна увреда /ИМУ/- съотв. разпределени по пол, възраст, локализация на лезията, стадий на МИ и ПАД .

При разработката на дисертационата тема д-р Михайлова е използвала голям набор от адекватни за целите на изследването методи, включващи: 1. **Рутинни хистологични методи** за анализиране на морфологичните показатели- за целта тъканите са обработвани по стандартния парафинов метод след фиксация в буфериран 10% неутрален формалин, като срези с дебелина 3-5 микрона са оцветявани с ХЕ. Първоначално материалите са обработвани в „Клиниката по обща и клинична патология“ при УМБАЛ, а впоследствие обработката е осъществена в „Катедра по анатомия и клетъчна биология“ при МУ-Варна.

2. **Имунохистохимични методи на изследване**, с приложен стандартен имунопероксидазен метод /пероксидазна имунохистохимия/ за ИХХ- анализ по съотв. протокол и използвана визуализираща система на DAKO- K8000; 3. **Флуоресцентна имунохистохимия**- прилагана за едновременното разкриване на 2-3 Аг на един и същи срез / двойна/тройна имунофлуоресценция/. Протоколът за обработка на материалите е аналогичен на този, използван при светлинна микроскопия; срезите са включвани в специална среда /Vectashield, Vector Labs/, съдържаща специфични реагенти, предназначени да съхраняват флуоресценцията. Списъци на използваните първични Ат, техният тип и прилаганата концентрация са представени в табл. 4.3. и 4.4. При провеждане на ИХХ- реакциите подробно са описани стъпките в подготовката на биопсичните материали за ИХХ-изследване, ИХХ- протокола, произход на използваните Ат и визуализиращи системи. Стриктно са спазени и всички елементи на методиката, вкл. технологичната дисциплина, описание и локализация на Ат-експресията, изработване на позитивни и негативни контроли за проверка на специфичността на имунните реакции, като критериите за позитивност са точно формулирани при отчитане на резултатите.

С помощта на микроскоп Zeiss Axio Imager.Z2 е осъществено **дигитализиране на микроскопските препарати** чрез метод на сканиране по типа на мозайка. Чрез софтуера Zeiss Zen v3.7и опция за автофокусиране е осъществено прецизно фокусиране на отделни части от мозайката, като по този начин е изключено въздействието на различни артефакти върху качеството на получените образи.

Анализ на оцветяванията. Осъществен е с помощта на Fiji-дигитална система за ръчно изброяване на /+/ клетки. Чрез опцията „multicount“дигиталната система автоматично изброява маркираните ръчно /+/ клетки в рамките на предварително зададен регион на интерес, като съхранява образ от броенето, без да изменя оригиналното изображение. За целта са използвани няколко ROI с р-р 1000/1000 μm при пероксидазното ИХХ-оцветяване и ROI 500/ 500 μm при флуоресцентните ИХХ- оцветявания.

Статистика. Резултатите от ръчно изброените +/- клетки са въведени в стандартни .xlsx таблици, като данните за отделните случаи са осреднени за всеки ROI. Вариабилността на данните е представена посредством изработване на графики със стандартно отклонение. За оценка на статистическата значимост на разликите в резултатите на отделните изследвани групи е използван Student's T test, като разликите са приемани за значими при $P < 0,05$. Въз основа на базата за експресията на различни маркери е представено процентното съотношение между популации от клетки.

РЕЗУЛТАТИ. Резултатите от проведеното в дисертационния труд изследване, и обсъждането представляват най-съществената и значима част от разработката, като демонстрират изключителна задълбоченост и опит за максимална обективност на авторката. Собствените данни са обсъдени в контекста на съвременните, проведени в световен мащаб изследвания, като стриктно са отчитани съответните статистически зависимости. Използването в проведената дискусията на голям брой актуални литературни източници повишава многократно научната стойност на дисертационния труд, като наред с това проличава умението на д-р Михайлова да борава добросъвестно с научната документация, изказвайки и собствено мнение по дискутируеми въпроси. Първоначално авторката прави кратък морфологичен анализ на постисхемичните човешки мозъчни тъкани, за адекватността на микроскопските изображения при които от ключово значение е важно дали мозъчната тъкан е свежа / замразена / или е фиксирана във формалин. Описанието на резултатите е представено в няколко етапа, като **първите два етапа** от проучването включват: 1. Определяне на количеството и разпределението на ZBTB20 +/- клетки в мозъчни срези от неувредена- контролна, и от постисхемична мозъчна тъкан, вкл. гъстотата и послойното им разпределение в крайномозъчната кора; проследяване чрез флуоресцентна имунохистохимия гъстотата на ZBTB20+ клетки на площ от 1 кв. мм в мозъчна тъкан без и с исхемична увреда; оценка на експресията на ТФ ZBTB20- с метода на флуоресцентна имунохистохимия / установяване количеството на ZBTB20 позитивните клетки спрямо цялата клетъчна популация, ядрата на която са маркирани с DAPI/; **третият етап включва:** ИХХ- изследвания на ZBTB20 в комбинация с други маркери, като: маркери за неврони /NeuN- протеин с ядрена локализация/; за астроцити- ZBTB20+/GFAP+ клетки и S100 β + клетки в мозъчна тъкан без и с исхемична увреда; съдов маркер- CD34; маркер за олигодендроцити- ТФ SOX10+ /NeuN; маркер за микроглия/ IBA1 /; тройно имунофлуоресцентно оцветяване- ZBTB20+ /SOX10+ / GFAP+ в мозъчна тъкан без и с исхемична увреда. Д-р Михайлова е изработила обобщен статистически анализ на промените, развиващи се в постисхемичните тъкани, поставяйки акцент върху: 1. Влияние на локализацията на МИ върху експресията на ТФ ZBTB20; 2. Влияние на морфологичната характеристика на МИ върху експресията на ТФ ZBTB20; 3. Разпределение на експресията на ТФ ZBTB20 според отстоянието на позитивните клетки от лезията; 4. Съотношението между различните клетъчни субпопулации в постисхемичните мозъчни тъкани. Получените резултати от направеното изследване дават основание да се формулират съществени изводи, въз основа на които е възможно да бъдат продължени изследванията в правилно

избраната от дисертантката посока. Заключение и изводи, които биха допринесли за доразвиване на първоначалната, залежала в дисертационния труд идея, могат да бъдат представени по следния начин:

1. За първи път у нас се демонстрира експресия на протеина ZBTB20 в клетки от крайномозъчната кора/ СМВ и прилежащо БМВ /на възрастен човек при физиологични условия, и в клетки след исхемична увреда в човешка крайномозъчна кора и перивентрикуларно; 2. Установено е послойно разпределение в крайномозъчната кора - наличие на голямо количество клетки с висок интензитет на експресия на ZBTB20 (ZBTB20 high + клетки) в повърхностните слоеве на крайномозъчната кора, и намален брой клетки с нисък интензитет на експресия на ZBTB20 (ZBTB20 low+ клетки) в по-дълбоките слоеве; 3. Осъществен е количествен анализ на ZBTB20+ клетки според локализацията им в СМВ и БМВ; установен е увеличен брой на ZBTB20 в БМВ спрямо СМВ в контролните тъкани, като най-голямо, със статистическа значимост е количеството на клетките в I-II слой от крайномозъчната кора /СМВ/; в постисхемичните тъкани по-голямо е количеството на ZBTB20+ клетки в БМВ спрямо СМВ / без статистическа зависимост/; 4. При направения сравнителен количествен анализ на експресията на ТФ ZBTB20 в контроли от адултна мозъчна тъкан и в постисхемична мозъчна тъкан се установява, че много по-висок е броят на + клетки в СМВ и БМВ с исхемична увреда спрямо експресиращите ZBTB20 + клетки в СМВ и БМВ без исхемична увреда; най-голямо е количеството на позитивни клетки в централната част / ядрото / на увредата, като броят им намалява при отдалечаване от центъра; 5. С две различни методики- пероксидазна ИХХ и флуоресцентна ИХХ е направен сравнителен количествен анализ на данните от получените резултати, които са със статистическа достоверност/посредством двете методики се регистрира увеличение с 1,8х на броя на ZBTB20+ клетки след ИМУ/; 6. При проследяване на фенотипа на ZBTB20 + клетки в мозъчната тъкан при физиологични условия и след ИМУ се установява, че липсва ко-експресия за ТФ ZBTB20 и протеина NeuN в зряла мозъчна тъкан при гризачи и маймуни, както и че липсва, установена за първи път, подобна ко-експресия в адултна човешка мозъчна тъкан от моторната кора; 7. Използването на идентифициращи астроцитите маркери GFAP+ S100 β показват за първи път, че ZBTB20+ клетки са в действителност GFAP+ астроцити в човешка адултна мозъчна тъкан от моторната кора, като всички ZBTB20 + клетки са /+/ и за GFAP, но не всички GFAP+ астроцити са позитивни за ZBTB20; 8. За първи път е направен анализ на разпределението на ZBTB20+/GFAP+ спрямо локацията сиво/бяло мозъчно вещество, като се установява, че в зоната на мозъчна увреда е повишено количеството на клетките, експресиращи посочените по-горе маркери; 9. Проследена с флуоресцентни Ат срещу CD34 е перивазалната локализация на ZBTB20+ клетки, установен е увеличен брой на ZBTB20 +клетки в мозъчната тъкан след ИМУ, и струпване на позитивни ZBTB20 +клетки около експресиращи CD34 ендотелни клетки на увредени кръвоносни съдове в мястото на лезията; 10. Проучено е значението на ТФ SOX10 като регулатор на процеса на трансдиференциация на астроцити в OPCs in vivo et in vitro; доказва се за първи път, че в адултна човешка мозъчна тъкан от моторната кора има единични експресиращи

SOX10 / GFAP+ глиални клетки, като броят на тези клетки е нарастнал в областта на МИ; установено е, че 10% от SOX10+/GFAP+ клетки експресират ТФ ZBTB20 в постисхемичната тъкан. На базата на общия произход на макроглията може да се предположи, че наблюдаваният клетъчен субтип SOX10+/GFAP+ZBTB20 +след МИ при човек, в съвкупност с реактивните астроглиални клетки и OPCs, всъщност е разновидност на една и съща клетъчна линия/ фиг.6.2/; 11. Периневроналните глиални клетки могат да бъдат класифицирани въз основа силата на експресията на ZBTB20+ SOX10 + в две подгрупи- ZBTB20 low+/SOX10+ ZBTB20 high+/SOX10- ; 12.Локализацията на мозъчния инфаркт, давността на лезията и наличието на хеморагична компонента в изследваните случаи не оказват влияние върху гъстотата на клетките, експресиращи ZBTB20. Количеството на клетките, експресиращи този маркер, зависи от разстоянието спрямо инфарктната сърцевина, като то е най-голямо в центъра ѝ. При сравнение на контролните с постисхемичните мозъчни тъкани се установява много голям брой позитивни ZBTB20 +клетки в СМВ и в БМВ с исхемична увреда спрямо позитивни клетки в СМВ и в БМВ без исхемична увреда; двете ИХХ-методики- пероксидазна имунохистохимия и флуоресцентна имунохистохимия показват статистически достоверна зависимост на получените резултати, като на площ от 1 кв.мм са изброени 290 ZBTB20+ клетки при контролите, и 526 + клетки за постисхемичните тъкани- т.е., регистрирано 1,8 x увеличение на броя на позитивните ZBTB20 клетки след мозъчна увреда; при проследяване фенотипа на ZBTB20+ клетки в мозъчни тъкани при физиологични условия и след исхемична увреда с използване на астроцитни маркери за първи път се показва, че ZBTB20+ клетки са всъщност GFAP-позитивни астроцити в човешка мозъчна тъкан; за първи път е направен анализ на разпределението на ZBTB20+ GFAP+клетки спрямо локацията сиво-бяло мозъчно вещество; повишено количество на двата маркера се установява и в зоната на мозъчна увреда; паралелен анализ на астроглиалните клетки е направен и с S100 β , като тези позитивни клетки представляват около 90% от GFAP+ позитивната клетъчна популация в контролите.

За първи път се демонстрира, че след ИМУ количеството на ZBTB20+/SOX10+ клетки нараства 15x спрямо клетките от контролната група; всички ZBTB20+/SOX10+ са GFAP+ NeuN -клетки; за първи път се предлага класификация на периневроналната сателитна глия, с установени 2 клетъчни субтипа: ZBTB20 low+ SOX10+ клетки и ZBTB20 high+ SOX10- клетки, които имат висок интензитет на експресия на ZBTB20 и не експресират SOX10. Слабо проучени са т.нар. „сателитни“ клетки около невроните, като все още, и до настоящия момент липсва установен молекулярен маркер за тяхната идентификация. Има предложение ZBTB20 да се прилага като маркер за оцветяване на периневроналната глия. Чрез направен акуратен анализ д-р Михайлова е открила молекулярна сигнатура, разграничаваща периневроналната сателитна глия на базата на диференцирана експресия на ТФ ZBTB20 и ТФ SOX10. Въпреки това, тя настоятелно предлага да бъдат осъществени допълнителни изследвания, с оглед подробно представяне на морфологията, локализацията и функцията на нови клетъчни субтипове в зоната МИ.

Изводи: От проведеното мащабно изследване са оформени 11 извода, които отговарят на поставените цел и задачи, формулирани са много добре и са логичен завършек от получените резултати. Приемам ги без забележки, във вида, в който са представени. С особена значимост се открояват някои от изводите, особено тези с № 1, 3, 4 и 7-11.

Приноси. Д-р Михайлова е формулирала 9 приноса, разделени в две групи-6 приноса с оригинален характер, сред които с особена актуалност и значимост са № 1, 2, 5 и 6, и 3 приноса с потвърдителен характер.

Авторефератът е изготвен в съответствие с приетите научни правила. Той достатъчно пълно, точно и адекватно представя дисертационен труд. Отпечатан е на 59 стр., включващи всички части на дисертационния труд, 4 таблици и 17 фигури. Съдържанието му дава пълна представа за цялостния дисертационен труд, като отразява постигнатите резултати, направените изводи и приноси. Публикационната активност на д-р Михайлова по отн. брой публикации, съдържание и стойност отговарят на изискванията за представяне на резултати от научни изследвания.

Заклучение: Дисертационен труд на д-р Михайлова на тема „Промени в глиални популации на човешки теленцефалон след исхемична увреда“ представлява завършено, много добре структурирано и с оригинални научни резултати проучване, имащо определено приносен характер за разрешаване на все още недостатъчно разгадани клинично-морфологични проблеми и възможности, свързани с диагностиката и лечението на пациенти с прекаран мозъчен инсулт. В представения труд- изцяло нейно лично дело, д-р Михайлова се откроява с много добра литературна осведоменост и стил при интерпретация на резултатите. Стойността на разработката се повишава и от факта, че за първи път у нас е извършено такова мащабно, с използване на богат набор от маркери и най-съвременни методи проучване в една деликатна, и трудна за осъществяване на изследване област от човешкото тяло. В представената дисертация се съдържат научни и научно-приложни резултати, имащи оригинален характер и отговарящи по актуалност, обем, приложени методи и качество на разработка, както и по значимост на приносите на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на МУ-Варна. Във връзка с гореизложеното давам напълно убедено своята положителна оценка и препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди ОНС „Доктор“ на д-р Виктория Детелинова Михайлова по научната специалност „Патологоанатомия и цитопатология“.

01.07.2024

Варна

Рецензент: доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова,

Заличено на основание чл. 5,
§1, 6. „В“ от Регламент (ЕС)
2016/679

