

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФ. Д-Р НИКОЛАЙ ЕЛЕНКОВ ЛАЗАРОВ, Д.М.Н.

ВЪРХУ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ

НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

ПО ДОКТОРСКА ПРОГРАМА “ПАТОЛОГОАНАТОМИЯ И ЦИТОПАТОЛОГИЯ”

АВТОР НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: Д-Р ВИКТОРИЯ ДЕТЕЛИНОВА МИХАЙЛОВА

ТЕМА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: *„ПРОМЕНИ В ГЛИАЛНИ ПОПУЛАЦИИ НА ЧОВЕШКИ ТЕЛЕНЦЕФАЛОН СЛЕД ИСХЕМИЧНА УВРЕДА”*

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р ИРИНА И. СТОЯНОВА-ВАН ДЕР ЛААН, Д.М.

Д-р Виктория Детелинова Михайлова е хоноруван асистент в катедрата по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет (МУ) „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна и лекар-асистент към Клиниката по обща и клинична патология на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна с призната специалност по патологоанатомия и цитопатология. През 2018 година тя е зачислена (със заповед № Р-109-52/15.01.2018 г.) за докторант в редовна форма на обучение по докторска програма „Патологоанатомия и цитопатология“ към катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология на МУ – Варна, където е провела основната част от експериментите по настоящата дисертация. След приключване на програмата за обучение и успешно положени изпити за покриване на докторантски минимуми по научната специалност и чужд език, със заповед № Р-109-180/01.03.2023 г. на Ректора на МУ-Варна след решение по протокол №82/20.02.2023 г., тя е отчислена от Факултетния съвет на факултет „Медицина” с право на защита пред научно жури.

Дисертационният труд на тема *„Промени в глиални популации на човешки теленцефалон след исхемична увреда”* е написан на 158 стандартни страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Титулна страница*, *Съдържание* – 3 стр., *Списък на използваните съкращения* – 3 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 40 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материал и методи* – 9 стр., *Резултати* – 46 стр., *Обсъждане* – 16 стр., *Заклучение* – 1 стр., *Изводи* – 1 стр., *Справка за приноса на дисертационния труд* – 1 стр., *Публикации, доклади и проекти във връзка с труда* – 2 стр., *Библиография* – 31 стр., включваща 358 литературни източника, един – на кирилица и 357 на латиница, *Благодарности* – 1 стр. Трудът е онагледен общо с 6 таблици и 49 фигури. При това, част от собствените фигури представляват табла с монтирани панели на микрофотографии, схеми и диаграми, така че действителният брой на представения илюстративен материал е значително по-голям.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на изключително актуален и значим проблем на фундаменталната и транслационна невронаука. В последните десетилетия се натрупаха достатъчно убедителни данни, че при гризачи и примати глиалните клетки имат решаваща роля в поддържане на хомеостазата в интактна и увредена мозъчна тъкан. Загатната е също потенциалната роля на активираната глия в модулиране на процесите на неврогенеза във възрастния мозък. В литературата са налице и данни за специфичното участие на транскрипционния фактор Zbtb20 в глиогенезата, установена е повишената му експресия в мозъка на гризачи и примати след исхемия, но специфичните молекулярни взаимодействия при исхемична мозъчна увреда не са проучени все още при човек. С оглед на това, познаването на сигналните молекули и регулаторни пътища, на механизмите, които направляват процеса на пролиферация, миграция и диференциация на тези клетки, както и на структурната и молекулярна пластичност на генната експресия в глиалните популации, би било от съществено значение за разбиране на молекулярните механизми на мозъчна исхемия с цел намиране на иновативен терапевтичен подход за подобряване на клетъчните отговори на увредения мозък. В този смисъл докторантката си е поставила амбициозната задача да изследва експресията на Zbtb20 в глиалните клетки на човешки краен мозък и да проследи промените в експресионните му нива в глиалните популации в условията на исхемична мозъчна увреда с цел да изясни влиянието на този транскрипционен фактор върху процесите на глиогенеза при човек.

Уводът е сравнително кратък, но достатъчно информативен, за да въведе читателя по подходящ начин в предмета на дисертационния труд.

Литературният обзор е много подробен и дава в тематично обособени подраздели обширна информация за ембрионалния произход, морфологичните особености, молекулярния и генетичен профил на различните видове невроглиални клетки в мозъка на бозайниците. Приведени са изчерпателни данни за морфологичната и функционална хетерогенност на подвидовете глиални клетки, маркерите за идентификацията им и транскрипционните фактори, регулиращи процесите на тяхната пролиферация и диференциация. По достъпен начин е представена известната до момента информация относно исхемичната мозъчна увреда, ролята на глията и взаимодействието между глиалните клетъчни популации при нея, както и влиянието на други увреждащи фактори. Детайлно са изложени транскрипционните фактори,

които са потенциално въввлечени в исхемичната мозъчна увреда, с акцент върху Zbtb20, като са изтъкнати аргументите за конкретния му избор като маркер, използван за проследяване на глиогенезата в исхемичен мозък. Литературните данни са подходящо илюстрирани с фигури и схеми, адаптирани от наличните библиографски източници. От цитираните литературни източници 161 (~45% от всички) са публикувани през последното десетилетие, вкл. шест статии от 2023 година и една статия от 2024 година, което е още едно доказателство за актуалността на разработвания проблем, пълнотата на библиографската справка и, не на последно място, за добрата литературна осведоменост на дисертантката по него. Според мен би било добре прегледът на литературата да завърши с кратък заключителен раздел или поне с един обобщаващ параграф, в който да се представи в резюмиран вид състоянието на разглеждания проблем и да се систематизират аналитично въпросите, които очакват решение в настоящето проучване. По такъв начин ще се аргументира работната хипотеза на проучването и ще се направи плавен преход към следващия раздел на дисертационния труд.

Целта е ясно и точно дефинирана, макар че не кореспондира напълно със заглавието на дисертационния труд, чиято формулировката е по-обща. В този контекст, проследяването на промените в експресионните нива на Zbtb20 в глиалните клетки е индикатор за тяхната важна роля при патологични състояния в човешкия мозък като мозъчна исхемия. **Задачите** са правилно поставени и, както ще се разбере от последващото изложение, са реално изпълними с помощта на използваните методи. По мое мнение, така формулираната първа задача изглежда ненужна, тъй като е очевидно, че експерименталната дейност изисква подходяща селекция, вземане на тъканни проби и тяхната подготовка за изследване. При това, критериите за подбор на тъканния човешки материал са дефинирани в следващия раздел. Освен това, отделните стъпки в процедурата по определяне на позитивирани структури/клетки и последващия анализ на установените находки са излишно детайлизирани. Вместо тях като конкретни задачи би могло да се запише извършване на образен и статистически анализ на получените данни.

Разделът **Материал и методи** е сравнително кратък, но достатъчно изчерпателен. Спазени са необходимите етични изисквания за работа с човешки трупен материал, протоколът на експерименталните процедури е одобрен и е налице разрешение за тяхното провеждане от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) към МУ-Варна. Цялата необходима информация относно обектите на изследването и използвания от тях

постмортален материал е дадена в подробни и високоинформативни таблици. Изследваните тъкани са подходящо групирани според давността на исхемичната увреда, посочен е точно постморталния интервал, който е от критична важност за запазване на прижизнената структура на взетия тъканен материал, а също и за успеха на имунохистохимичните реакции. Тяхното описание, а също и това на проведените образен и статистически анализ на получените дигитални изображения са дадени с акуратност и стъпка-по-стъпка последователност, позволяваща тяхната повтораемост от други изследователи. Потребната информация за използваните в изследванията първични и вторични антители, гостоприемника, работните разреждания и техния производител са дадени в прегледни таблици. Описани са приложените (позитивни и негативни) контролни оцветявания, които са от съществено значение за специфичността на всяка имунохистохимична реакция.

Разделът **Резултати** е изложен на цели 46 страници, което е близо една трета от целия текст, вкл. библиографията. Той е разделен на отделни, описателно формулирани подраздели, и е развит в последователност, следваща хронологично поставените експериментални задачи. Изложението започва с морфологично описание и анализ на постисхемичната човешка мозъчна тъкан като необходима предпоставка за интерпретиране на хистопатологичните и имунохистохимични находки. Чрез имунохистохимия с индиректна пероксидазна техника са идентифицирани Zbtb20-позитивните клетки в изследваните зони от крайномозъчната кора на контролните и постисхемични тъкани, определена е тяхната локализация и количество. Установена е статистическа значима разлика в послойното разпределение на Zbtb20-имунореактивните клетки в интактния мозък, с превалирането им в повърхностните мозъчни слоеве и липсата на подобна корелация в постисхемичните тъкани. Количественият анализ демонстрира също, че броят и гъстотата на имунопозитивните клетки са много по-големи в сивото мозъчно вещество и са умерено увеличени в бялото мозъчно вещество в тъканите след исхемична увреда в сравнение с контролите. Последващото имуофлуоресцентно оцветяване е разкрило, че броят на Zbtb20-експресиращите клетки в постисхемични мозъчни тъкани е нараснал 1.8 пъти спрямо средното им количество в контролните тъкани. Комбинираните оцветявания с клетъчни маркери са позволили на докторантката да направи фенотипен анализ на Zbtb20-позитивните клетки и да идентифицира тяхната точна клетъчна принадлежност като астроглиални клетки, които представляват около 65-66% от цялата астроцитна популация в

интактен и исхемичен мозък, като част от тях са периваскуларно разположени. Намерено е също, че Zbtb20 се експресира само в единични олигодендроцити в контролните срезове и многократно (15х) повече в SOX10-позитивните клетки в срезове с исхемична мозъчна увреда, но такава експресия липсва в микроглиалните клетки в двете групи. При това, множество белязаните клетки в постисхемичните тъкани показват морфологични белези на реактивни глиоцити. Акуратният количествен анализ е показал, че количеството и гъстотата на Zbtb20-позитивните клетки не се влияе от локализацията и давността на исхемичната лезия, а зависи единствено от отстоянието им от инфарктната сърцевина. Не на последно място, детайлният анализ на молекулярния профил на глиалните мозъчни клетки е помогнал на Михайлова да обособи четири субпопулации на глиоцити в постисхемичните човешки мозъчни тъкани.

Специално отбелязване заслужава факта, че всички авторски находки са солидно подкрепени от богат илюстративен материал. Като цяло, оценявам високо **фотодокументацията** към дисертационния труд. Особено демонстративни за наблюдаваната множествена застъпеност на антигени в една и съща клетка са приложените микрофотографии от имунофлуоресцентните изображения, които с малки изключения са с отлично качество. В същото време, статистическите данни, представени като графики и диаграми, дават богата и прегледна информация за установените количествени показатели в броя и процентното съотношение на Zbtb20-позитивните клетки в интактна и исхемична мозъчна тъкан.

Дискусията, макар и не особено пространна, е много добре написана и показва завидното умение на дисертантката за обсъждане на собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в релевантната литература, и интерпретирайки ги адекватно да направи ценни изводи за количеството и фенотипа на глиалните популации в исхемично променения човешки мозък. Наред с очакваното присъствие на Zbtb20-експресиращи клетки с диференцирано послойно разпределение в сивото и в бялото мозъчно вещество и фенотипизирането им като глиални, определен интерес представлява обсъждането на потенциалното участие на този транскрипционен фактор в човешкия мозък в норма и исхемична патология. На основата на паралелен количествен анализ на разпределението на Zbtb20-имунопозитивните глиоцити в мозъчните зони с постисхемична реактивна глиоза, авторката логично приема че исхемията повишава експресията на Zbtb20 в астроглиалните клетки, а той от своя страна регулира процеса на постисхемична глиогенеза. От друга страна,

фенотипният анализ на Zbtb20-позитивните клетки е насочил Михайлова към закономерното заключение за ангажирането основно на астроглиални клетки в този процес. Освен това, въз основа на експресионния афинитет към молекулярните ѝ маркери е обсъдена идеята за подразделяне на периневроналната сателитна глия на два клетъчни подтипа. Заслужава внимание и оригиналното авторско допускане клетките с комбиниран SOX10+/GFAP+/ZBTB20+ имунофенотип да представляват разновидност на една и съща клетъчна линия. За съжаление тази възможност е само загатната и изисква бъдещи изследвания. Следва също да се подчертае обоснованото внушение на дисертантката за използване на астроглиалната популация като потенциален таргет на възстановителна клетъчна терапия при невродегенеративни заболявания и исхемична увреда на мозък. Не на последно място, особено полезен, според мен, е анализът на техническите трудности, съпътстващи обработката на исхемично променения материал от мозъчна тъкан.

Висока аналитична стойност има и обособения в края на дискусията кратък раздел, в който в резюмиран вид са обобщени **заключителните бележки** на докторантката относно установените в това изследване факти и са очертани насоките за бъдещи изследвания по проблема. Нещо повече, тези бележки са послужили за по-добра основа за прецизно формулиране на **изводите** от настоящото проучване. Те са конкретни, написани са много стегнато и точно отразяват авторските заключения, произтичащи от натрупаните нови данни. Като цяло приемам без забележки тяхната формулировка и научна стойност. Научните постижения на дисертантката по темата на изследването са изведени в отделен раздел под формата на кратка справка и са категоризирани като оригинални и потвърдителни.

Основните приноси на дисертационния труд биха могли да се резюмират както следва:

1. Настоящото проучване е първото, което привежда достоверни данни за експресия на транскрипционен фактор Zbtb20 в крайномозъчната кора в интактен и постисхемичен човешки мозък.
2. Оригинална находка е установената експресия на транскрипционни фактори Zbtb20 и SOX10 в невроглиални клетки на постисхемичен краен мозък.
3. За пръв път експериментално се доказва постисхемична глиална пролиферация и е документиран ефекта на мозъчната исхемия върху постисхемичната глиогенеза в адултен човешки мозък.

4. Изложени са оригинални данни за налична молекулярна хетерогенност на периневроналната сателитна глия и е предложена нова клетъчна фенотипизация.
5. Приведени са потвърдителни данни за реактивна глиална реакция в човешка голямомозъчната кора след исхемично увреждане.

Няма съмнение, че настоящият дисертационен труд е лично дело на В. Михайлова. Безспорно доказателство за тази моя констатация, наред с приложената в документацията декларация за оригиналност на разработката, са представените от нея научни публикации и съобщения по темата на дисертацията. Експериментите по дисертационния труд са част от два научноизследователски проекта, удостоверено със съответните уверения. Авторските находки са публикувани в три статии в наши научни списания, като в две от тях Михайлова е първи автор. В библиографски бази данни се открива и друга статия с нейно водещо участие в Q1 списание с импакт фактор (*Mihailova et al.: Biomedicines* 2023, 11(9):2332), която обаче не е включена в списъка с публикации по темата, а справката в Scopus показва, че до този момент тя е получила едно цитиране. Получените резултати са докладвани на две научни прояви у нас и на четири форума с международно участие, но два от докладите нямат посочен авторски колектив. На рецензента не са известни цитирания на тези научни трудове в трудовете на други автори и/или в други литературни източници. С оглед на актуалността на разглеждания научен проблем и оригиналността на получените данни, бих си позволил настоятелно да посъветвам докторантката и нейните научен ръководител и консултант да продължат да популяризират резултатите от това проучване в международната научна периодика.

Дисертацията е написана разбираемо и в добър научен стил. Употребата на специфична терминология обаче я прави неособено лесна за разбиране от неспециалистите в тази област. Освен това в текста на дисертацията са използвани много съкращения, макар че част от тях като ДНК и ЦНС са общоизвестни абrevиатури. Нещо повече, в автореферата те са изписани единствено в списъка на съкращенията, но не са дефинирани при първата им поява в текста, което допълнително затруднява читателя. Авторефератът на дисертационния труд е изготвен съгласно изискванията; той отразява обективно, адекватно и в достатъчен обем състоянието на изучавания проблем, поставените цел и експериментални задачи, използваните методи за тяхната практическа реализация, получените резултати, тяхното аналитично описание и интерпретиране на собствените данни, както и направените авторски изводи и приноси.

В заключение считам, че дисертационният труд на д-р Виктория Михайлова е комплексно и задълбочено проучване върху интересен и актуален проблем на съвременната фундаментална и транслационна невронаука. То е добре замислено и прецизно методично обосновано изследване, проведено е много акуратно и е илюстрирано отлично. Получените данни са ясно и добросъвестно дискутирани и допринасят за разширяване на наличното познание за исхемичната мозъчна увреда. Независимо от някои посочени по-горе недостатъци на труда, резултатите от изследването внасят оригинален и теоретично-приложен принос за изясняване ролята на определени транскрипционни фактори и молекулярните механизми при исхемична мозъчна увреда, и тяхното потенциално приложение за разработване на нови терапевтични стратегии за възстановяване на увредения мозък. Представеният труд отговаря на законовите изисквания за придобиване на научно-образователната степен «доктор» в Закона за развитието на академичния състав в Република България, на Правилника за неговото приложение и на критериите за присъждане на научни степени, залегнали в Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Варна. Въз основа на всичко гореизложено, като рецензент убедено изказвам положително мнение за разработения дисертационен труд и в качеството ми на член на Научното жури по процедурата давам своя положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „доктор” в област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт”, професионално направление 7.1. Медицина, по научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“ на Виктория Детелинова Михайлова.

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

Рецензент:

(проф. д-р Николай Лазаров, д.м.н.)

01.07.2024 год.
гр. София