

# РЕЦЕНЗИЯ

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

## ОТНОСНО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА ВЕСЕЛИНА ГЕОРГИЕВА ЖЕКОВА ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

Д-р Веселина Георгиева Жекова е асистент в катедрата по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет (МУ) „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна с призната специалност по анатомия, хистология и цитология (свидетелство № 014269/20.02.2009 г.). През 2015 година е зачислена за докторант на самостоятелна подготовка (Заповед № Р-109-116/22.04.2015 г.) към същата катедра, където е провела основната част от експериментите по настоящата дисертация. След приключване на програмата за обучение и успешно положен изпит по научната специалност, със Заповед № Р-109-17/28.01.2019 г. на Ректора на МУ-Варна тя е отчислена от Факултетния съвет на факултет „Медицина” с право на защита пред научно жури.

Дисертационният труд на тема *„Количество и фенотип на de novo генерирани клетки в постисхемичен малък мозък на възрастни примати”* е написан на 146 страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Съдържание* – 2 стр., *Списък на използваните съкращения* – 2 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 40 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материал и методи* – 9 стр., *Резултати* – 50 стр., *Обсъждане* – 14 стр., *Изводи* – 1 стр., *Справка за приносите* – 1 стр., *Библиография* – 24 стр., включваща 249 заглавия, 4 на кирилица и 245 на латиница. Трудът е онагледен с 3 таблици и 81 фигури. При това, повечето от собствените фигури представляват табла с поредица от монтирани микрофотографии, така че действителният брой на представения илюстративен материал е значително по-голям.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на един изключително актуален и значим фундаментален проблем на невробиологията и репаративната медицина – този за възрастовата неврогенеза у бозайниците. В последните десетилетия се натрупаха достатъчно убедителни данни, че при гризачи и примати неврогенезата продължава и след раждането в отделни мозъчни зони, известни като неврогенни ниши, където са идентифицирани нервни стволови клетки. Такива клетки са установени в ембрионален неокортекс и стриатум, а при повечето възрастни бозайници те присъстват в субгрануларната зона на *gyrus dentatus* у хипокампа и субвентрикуларната зона на латералния вентрикул, но

малко доказателства съществуват понастоящем за наличие на стволови клетки в малкия мозък при израснали индивиди. Наред с това, познаването на вътреклетъчните фактори и екстрацелуларни сигнални пътища, които направляват процеса на пролиферация, миграция и диференциация на невралните прекурсори и/или контролират процеса на генериране на нови неврони, е от съществено значение за разбиране на молекулярните механизми на мозъчна исхемия с цел намиране на адекватен терапевтичен подход за възстановяване на увредения мозък. В този смисъл докторантката си е поставила амбициозната задача да установи количеството и фенотипа на новообразуваните неврони в кората на постисхемичен малък мозък у възрастни примати като проследи възрастовите и исхемично-индуцирани промени в експресията на някои транскрипционни фактори в тях.

**Уводът** е кратък, стегнато написан и въвежда по подходящ начин читателя в предмета на дисертационния труд.

**Литературният обзор** е твърде подробен и дава в тематично обособени подраздели обширна информация за ембриогенезата на централната нервна система, вкл. на развиващия се малък мозък у бозайниците, както и за неговия хистологичен строеж. Приведени са изчерпателни данни за малкомозъчната хистогенеза, пренатална и постнатална морфогенеза с акцент върху молекулярните механизми на контрол на ембрионалната неврогенеза в малкия мозък на примати. По достъпен начин е представена известната до момента информация относно идентифицираните стволови клетъчни ниши в главния и малкия мозък през постнаталната онтогенеза. Детайлно са изложени методите за изследване на неврогенезата и са изтъкнати аргументите за конкретния избор на клетъчно-специфични маркери, използвани за проследяване на етапите на неврогенеза. Обзорът завършва с подробно описание на приложения глобален исхемичен модел за мозъчна увреда. Литературните данни са подходящо илюстрирани с фигури от класически учебни помагала и научни статии. От цитираните литературни източници 94 (~38% от всички) са публикувани през последното десетилетие, 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 с настоящето проучване. По такъв начин ще се направи плавен преход към следващия раздел на дисертационния труд.

**Целта** е ясно и точно дефинирана. Формулировката „с оглед на възстановителните процеси“ обаче е много обща, по-добре би било в нея да се конкретизира очакваното приложение на авторските находки в репаративната медицина. **Задачите** са правилно поставени и, както ще се разбере от последващото изложение, са реално изпълними с помощта на използваните методи. По мое мнение, така формулирана последната задача изглежда ненужна, тъй като е очевидно, че анализът на получените резултати ще завърши с обобщения и изводи. Вместо нея като конкретна задача 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 при работа с експериментални животни и техния брой е сведен до необходимия минимум за постигане на статистически достоверни резултати. Описанието на приложените методики (хирургични процедури, инжектиране на BrdU, обработка на тъканите и последващи имунохистохимични реакции), а също и проведените образен и статистически анализ на данните са дадени с акуратност и стъпка-по-стъпка изчерпателност, позволяваща тяхната повторемост от други изследователи. Необходимата информация за използваните в изследванията първични и вторични антители, гостоприемника, работните разреждания и тяхното предназначение са дадени в прегледни таблици. Съществен недостатък на този раздел е липсата на задължителното описание на приложените контролни оцветявания, които са от критична важност за специфичността на всяка имунохистохимична реакция.

Разделът **Резултати** е изложен на цели 50 страници, което е близо половината от целия текст без библиографията, един забележителен обем на изложение на собствените резултати. Той е разделен на отделни, описателно формулирани подраздели, и е развит в последователност, следваща хронологично поставените експериментални задачи. След интравентрикуларно инжектиране на тимидиновия аналог BrdU са идентифицирани във възрастов аспект пролиферативните хистологични зони в малкия мозък на новородени, едногодишни и половозрели маймуни и са установени статистически значими различия между броя на пролифериращите клетки в сивото и бяло малкомозъчно вещество.

Достоверни количествени разлики са намерени и в броя новообразувани клетки в молекулярния и гранулозния слоеве на малкомозъчната кора и бялото вещество в две (*spinocerebellum* и *cerebrocerebellum*) от трите функционални части на постисхемичния малък мозък. В конкретен план е установено, че глобалната мозъчна исхемия индуцира клетъчна пролиферация в тези слоеве с подчертано предимство за *cerebrocerebellum*'а. Във възрастов аспект, този стимулиращ пролиферацията ефект е силно изразен в краткосрочен план, с последващ спад в средносрочен план и нов пик в дългосрочен план. От друга страна, не са намерени статистически значими разлики между общия брой на новогенерираните клетки в пробите от контролната група и животните с исхемия. Прилагайки имунохистохимично оцветяване за Calbindin е установено намаление, в различна степен между отделните части, в броя на клетките на Пуркиние в ганглийния слой на малкомозъчната кора във всички изследвани групи животни. Акуратният анализ на фенотипа на новообразуваните клетки в малкия мозък във възрастов аспект е разкрил отсъствие на колокализация на маркера за пролиферация Ki67, както с маркери за развиващи се и мигриращи неврони, така и с транскрипционния маркер за неврални прогенитори Pax6. В същото време, Жекова е установила колокализация на пролиферативния маркер BrdU с астроглиалния маркер GFAP и микроглиалния маркер Iba1, и е намерила единични клетки, двойнобелязани с BrdU и клетъчния маркер за постмитотични неврони – NeuN. В допълнение, проследяването на клетъчната експресия на транскрипционните фактори Pax2 и Pax6, които играят роля на маркери за ранни прогенитори и/или стволови клетки, е позволило на дисертантката успешно да категоризира в хронологичен порядък полифериращите клетъчни популации. Така например, проследявайки паралелната експресия на Pax6 с BrdU във външния гранулозен слой на малкомозъчната кора, Жекова е забелязала че той е добре представен при новородени маймуни, което ѝ е дало основание да заключи че външният гранулозен слой представлява източник на гранулозни прогениторни клетки, оформящи дефинитивния гранулозен слой. По-нататък, е установено че с възрастта този слой се редуцира до неговото пълно изчезване в малкия мозък на краткосрочната група експериментални животни. Фенотипизирането на субпопулации от прогенитори в слоевете на развиващия се малък мозък е недвусмислено демонстрирано чрез двойно белязване за Pax6 с Calbindin и GFAP, което е позволило на докторантката да идентифицира тяхната точна клетъчна идентичност.

Специално отбелязване заслужава факта, че всички авторски находки са солидно подкрепени от богат илюстративен материал. Като цяло, оценявам изключително високо **фотодокументацията** към дисертационния труд. Особено демонстративни за наблюдаваната множествена застъпеност на антигени в една и съща клетка са приложените микрофотографии от лазерно-сканираща конфокална микроскопия, които без изключение са с отлично качество. В същото време, статистическите данни, представени като хистограми, дават богата и прегледна информация за установените количествени показатели в броя и процентното съотношение на BrdU-белязаните клетки.

**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 новогенерираните клетки в малкия мозък, и значението на тези данни за клиничната терапевтична практика. Наред с логичното заключение за намаляване на степента на клетъчна пролиферация с възрастта, определен интерес представлява обсъждането за ролята на исхемията за усилената прогениторна пролиферация в малкия мозък и, по-конкретно, за разликите в пролиферативния индекс на новообразуваните клетки между отделните хистологични слоеве и функционални части на малкия мозък. Определен практически интерес представляват и потвърдителните доказателства за дегенеративните промени в клетките на Пуркиние и липса на невrogenеза в постисхемичния малък мозък на примати, което корелира с непроменените експресионни нива на Pax2 и Pax6 в малкомозъчната кора. От друга страна на основата на фенотипния анализ на новогенерираните клетки, авторката приема че това са глиални клетки, основно изолирани астроцити, микроглиални клетки и Бергманова глия. Силно впечатление прави също така функционалната интерпретация на установените Pax2-позитивни клетки в кората на развиващ се приматен малък мозък като ранни невронални прогенитори на инхибиторните малкомозъчни неврони. За съжаление тази идея е само загатната и изисква бъдещи изследвания за установяване последваща клетъчна диференциация на невроналните прекурсори до зрели неврони и тяхната функционална специализация.

В тази връзка считам, че стойността на дисертационния труд би се повишила и ако в кратък раздел след дискусията в резюмиран вид бяха обобщени **заключителните бележки** на докторантката относно установените в това изследване факти и бяха очертани насоките за

бъдещи изследвания по проблема. Нещо повече, тези бележки биха 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 в настоящето изследване са изведени в отделен раздел под формата на кратка справка, без да бъдат категоризирани като фундаментални и/или научно-приложни. **Основните приноси** на дисертационния труд, които имат определен оригинален характер, биха могли да се резюмират както следва:

1. Настоящото проучване, доколкото ми е известно, е първото, което привежда убедителни данни за клетъчна пролиферация в кората на развиващия се малък мозък у примати и установява сравнителни различия в пролиферативната активност между функционалните му части.
2. За пръв път експериментално се доказва ефекта на глобалната мозъчна исхемия върху количеството и фенотипа на новогенерираните клетки в отделните хистологични слоеве на малкомозъчната кора.
3. Оригинална находка е установената експресия на транскрипционни фактори Pax2 и Pax6 в кората на постисхемичен малък мозък и е направено фенотипизиране на експресиращите ги клетки.
4. Приведени са потвърдителни данни за реактивната глиална реакция и невронална загуба в малкомозъчната кора след исхемично увреждане при примати.

Няма съмнение, че настоящият дисертационен труд е лично дело на д-р Веселина Жекова. Безспорно доказателство за тази констатация, наред с приложената в документацията декларация за оригиналност на разработката, са представените от нея научни публикации и съобщения по темата на дисертацията, като във всички тях тя е водещ автор. Резултатите от експериментите са публикувани в три статии в наши научни списания и докладвани на две морфологични прояви у нас с международно участие. 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 направят необходимото за популяризиране на резултатите в международната научна периодика.

Дисертацията е написана разбираемо и в добър научен стил, забелязват се само единични правописни грешки. Употребата на сравнително малко чуждици и точното използване на специфичната терминология я прави лесно разбираема и за неспециалистите в тази област. В текста са използвани немалко съкращения, но част от тях като ДНК и ЦНС са общоизвестни абривиатури. Авторефератът на дисертационния труд е изготвен съгласно изискванията; той отразява 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 Веселина Жекова е комплексно и задълбочено проучване върху интересен и актуален проблем на съвременната невронаука. То е добре замислено и е прецизно методично обосновано, проведено е много акуратно и е илюстрирано отлично. Получените данни са ясно и добросъвестно дискутирани и допринасят за разширяване на наличното познание за процеса на пролиферация, миграция и диференциация на стволови/прогениторни клетки в ЦНС. Независимо от някои посочени по-горе недостатъци на труда, резултатите от изследването внасят оригинален и теоретично-приложен принос за изясняване ролята на факторите и механизмите на възрастовата неврогенеза, и тяхното 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». 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” на Веселина Георгиева Жекова.

Рецензент:   
(проф. д-р Николай Лазаров, д.м.н.)

18.03.2019 год.  
гр. София