

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

Проф. д-р Константин Асенов Койчев, дмн (доктор хонорис кауза. мулт)

Относно: Дисертационен труд на д-р Светла Пенчева Досева, главен асистент в катедрата по анатомия, хистология, цитология и биология“ при МУ - Плевен

на тема “Морфологични аспекти в развитието на кохлеарния нуклеарен комплекс“

за придобиване на образователна и научна степен «Доктор» по област на висшето образование „7. Здравеопазване и спорт“, професионално направление „7.1. Медицина“, научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“ (03.01.02.)

Дисертационният труд на д-р Пенчева е посветен на някои аспекти от развитието на кохлеарния ядрен комплекс по отношение на морфологията и отчасти цитохимията и молекулярната биология. Важността на този тип изследвания, особено в последните години има сериозни основания. Съществуват определени неясноти в морфологичното развитие на клетъчните популации в кохлеарния комплекс и матурацията на техните синаптични връзки. Противоречиво е и мнението за разпределението на различните клетъчни видове в различните зони на комплекса. Тези разлики са особено изразени при млекопитаещите. Дискусионно е и значението на отделните клетъчни типове както и ролята им в трансмисията и модифицирането на нервните импулси.

Развитието на клетъчните структури и техните синаптични контакти във феталният и постнаталния период има не само теоретично, но и важно практическо значение. Развитието на техниките за слухово протезиране и превръщането на кохлеарната имплантация в рутинен метод изискват познания за морфологичното и функционално развитие на първичните слухови ядра, което е важно за определяне на оптималните срокове за оперативна интервенция и поставяне на импланти. Този тип изследвания са в основата и на ототоксичитета, предизвикан от определени

медикаменти (напр. ототоксични антибиотици), приложени в периода на бременността, когато се извършва клетъчната диференциация и се формират синаптичните контакти – т.нар. критичен период.

С тези бележки искам да посоча, че настоящото изследване е актуално както в теоретично, така и в практично отношение.

Представеният за рецензия труд съдържа 207 стандартни страници, разпределени както следва: Увод – 2 стр., Литературен обзор - 60, Собствени изследвания - 60, в които са включени 115 фигури и 15 диаграми.

Авторката си поставя 4 основни задачи, които обобщено съдържат:

- 1) Изследване на морфологията на клетъчните видове в предното кохлеарно ядро в развитие, клетки които са основни мишени на аферентните нервни влакна, произхождащи от първия неврон на слуховия път.
- 2) Изследване на синаптогенезата в ядрото по време на т.нар. „критичен период“, както в областта на макроневроните, така и в грануларноклетъчния слой.
- 3) Проучване на структурните промени в организацията на кохлеарния ядрен комплекс след аблация на периферния анализатор.
- 4) Доказване на експресията на глутаматните рецепторни субединици от типа GluR1,2,3 във вентралното слухово ядро.

За изпълнение на тези задачи авторката е използвала подходящи методи, а именно: метод на Nissl, оцветяване с крезилвиолет, трансмисионна електронна микроскопия, морфометричен анализ на клетъчните популации и имунохистологичен индиректен метод за доказване на глутаматни рецепторни субединици.

Използвани са достатъчно експериментални животни (104 броя), плъхове от породата Wistar, при спазване на етичните изисквания при подобни експерименти.

Преценката ми за литературния обзор, който включва голямо количество автори 539 показва добро познаване на проблематиката от страна на авторката и постиженията в тази област. Този обзор е подходящ за един монографичен труд или като литературен обзор на тази тематика и ценен източник за автори, които проявяват интерес за работа в тази научна област.

В раздела собствени изследвания по метода на Nisl д-р Пенчева потвърждава хипотезата, че различните типове макроневрони в предното кохлеарно ядро се диференцират на различна възраст след раждането. Матурационният процес при белите плъхове приключва на 60-ия ден. Тя установява, че матурацията се извършва в две фази: първа фаза на бързо нарастване, когато невроните достигат 90% от нормалните за зрели неврони големина и втора бавна фаза на нарастване, съчетана с пълно морфологично съзряване на клетъчния вид. Тези фази са установени и при други бозайници (котки, бели мишки и др.) и правилно авторката заключава, че матурацията се извършва по общ план при всички бозайници, но с различни срокове. Резултатите са илюстрирани с отлична документация, представена в 23 фигури и 7 хистограми и една диаграма, илюстрираща двете фази на матурация на глобуларни и октоподни клетки.

Авторката обяснява значението на матурацията на кохлеата, както и достигането на еференции от по-горни слухови центрове за окончателно структуриране на предното кохлеарно ядро и процесите съпровождащи програмираната клетъчна смърт.

Много добро постижение на авторката е детайлното описание на променящата се морфология на каликсообразните нервни окончания на Хелт по време на синаптогенезата, илюстрирано от 26 електронограми с отлично качество и безспорна доказателствена стойност.

Д-р Пенчева правилно обяснява генезата и морфологичното разнообразие на нервните окончания на Хелт като израз на молекулярното взаимодействие на адхезионните молекули на пресинаптичните мембрани на аксосоматичния синапс и специфични маркери, определящи необичайната форма на нервното окончание като чаша (каликс). Д-р Пенчева правилно интерпретира описаните като пръчици ядрени включвания, които се представиха преди като кристаловидни структури. Действително те представляват комплекс от филаменти, изградени от протеинови молекули.

Известно е, че нормалното развитие и функциониране на централните отдели на слуховата сензорна система е пряко зависимо от нормалната структура и функция на периферния рецепторен орган. От друга страна, слуховите центрове на крайния мозък повлияват редица мозъчни функции като памет, емоционална сфера, светоусещане и социална адаптация. Също

така тези центрове изпращат еференции към по-нискостоящите ядра на слуховия път, включително в кохлеарния ядрен комплекс, които имат важно значение за неговите нормални функции, клетъчно диференциране и оцеляване. В този смисъл резултатите, получени след отстраняване на кохлеата по оперативен път и промените в кохлеарния ядрен комплекс са показателни.

Д-р Пенчева наблюдава дегенеративни промени в период от време, когато се сумират последствията на програмираната клетъчна смърт и промените в резултат на отсъствие на аферентации след отстраняване на кохлеата. Известно е, че синаптични контакти в кохлеарните ядра се формират някъде около P11, когато е възможно да се регистрират и първите акционни потенциали. Д-р Пенчева отбелязва, че има неврони с различна резистенция, напр. в периферията се намират най-резистентните на интервенцията неврони, в сравнение с другите, които показват по-бързи и явни признаци на дегенерация. Авторката правилно посочва и прави извода, че критичният период в онтогенезата на слуховата сензорна система има важно значение по отношение уязвимостта на кохлеарния ядрен комплекс от различни въздействия (вирусни инфекции, ототоксични антибиотици, менингити и др.).

Експерименти с депривация на Кортиевия орган при възрастни животни не води до резки дегенеративни изменения в ядрата, както правилно интерпретира д-р Пенчева, поради вече изградени достатъчно синаптични контакти от еферентни нервни влакна и вътреядрени междуклетъчни синапси.

Една част от изследванията на д-р Пенчева е посветена на т.нар. грануларноклетъчен домен в кохлеарните ядра. Още Lorente de No допуска съществуването на т.нар. специфични и неспецифични части на пътя на слуха. Касае се за сегменти на пътя на слуха извън класическия *lemniscus lateralis*. Предполага се, че този нелемнискален път започва от грануларните клетки на слуховите ядра и има значение за модулирането и филтрирането на определени звукови фреквенции, интегриращи се с други сетивни системи – вестибуларна, проприоцептивна, екстрапирамидна и др.

Ролята на тези функционални кръгове е предмет на множество дискусии и хипотези. Това оправдава интереса на дисертантката за изследване на тази малко позната област. Присъствието на множество

различни по морфология и сложност синаптични контакти в тази зона прави изследването важно в морфологично и функционално значение.

Авторката прецизно описва различни видове синапси от гломерулен тип с едно голямо разнообразие на дендритните форми. Тя успява да типизира по определен и добре документирани морфологични белези няколко типа синапса: класически грануларноклетъчни гломерули, UBC - синаптични гломерули и гломерули от смесен тип.

Твърде трудно е интерпретиране на синапсите и свързването му с определени функции и авторката с основание се въздържа от спекулации, цитирайки само определени хипотези. Тя прави удачни аналогии с подобни структури в зърнестия слой на кората на малкия мозък и допуска, че част от големите мъховидни влакна произхождат от центрове извън кохлеарната област.

Накрая трябва да подчертаем, че различните клетъчни типове в грануларните зони и техните синаптични контакти са описани в детайли с много добра електронно-микроскопска документация.

Във всички зони на кохлеарния ядрен комплекс са доказани AMPA рецепторни комплекси. По време на развитието се установяват промени в състава на AMPA рецепторните субединици и определен пластицитет с променящо се съдържание на ранните субединици GluR1,2 при незрелите неврони и GluR3 и GluR4 при зрелите неврони.

Д-р Пенчева представя резултати от имунохистохимичното изследване на три субединици на глутаматния рецепторен комплекс, а именно GluR1, GluR2 и GluR3, като експресията се определя качествено, като слаба, средна и силно позитивна. Изследването е проведено върху 3 вида неврони в предното кохлеарно ядро: сферични, глобуларни и октоподни клетки. Документирани са промените в различните периоди на морфологична матурация. Установява се, че промените в периода до P11 са сравнително бавни, докато в периода от P11 – P24 до P30 динамиката рязко се увеличава и достига имунопозитивиране характерно за възрастните животни. Ролята на GluR1 за формиране на ранните синапси не е категорично доказана, но се свързва повече с експресията на растежни фактори. Установяването на GluR2 и GluR3 с по-висока експресия се свързва с контрола и регулацията на калцевия инфлус и регистрирането на

първите акционни потенциали, както правилно интерпретира резултатите си авторката.

Може само да се съжالياва, че д-р Пенчева не е притежавала антитела за GluR4 за по-пълно представяне на имунохистохимията на рецепторните субединици на АМПА.

Изводът, който прави дисертантката е, че АМПА рецепторния комплекс в периода на развитието динамично се променя, при което различните рецепторни субединици се експресират или изчезват във връзка с матурацията на невроните и техните синаптични контакти. Една действително забележима динамика и пластичност.

С представените приноси на авторката съм съгласен. Принос №6 има потвърдителен характер.

Във връзка с дисертационния труд са представени 4 публикации и 6 участия от конгреси и конференции, в които са включени данни от резултатите върху цитоархитектониката на вентралното слухово ядро, матурацията на някои видове макроневрони, резултати след деструкция на кохлеата и ултраструктурата на грануларноклетъчната система.

Общият брой на научните трудове на д-р Пенчева е 53, от които 18 публикации и 24 участия свързани със слуховата сензорна система и 11 участия в други области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Познавам лично изследванията на д-р Пенчева, направени в катедрата по Анатомия, хистология и цитология в Плевен. Авторката владее използваните методики, както и изключително трудните техники за вземане на материал и оперативна интервенция върху вътрешното ухо. Д-р Пенчева показва отлично познаване на литературата по проблематиката, което ѝ позволява да открива бели петна и спорни резултати, които сравнява със своите изследвания и компетентно дискутира в обсъждането. Обширният литературен обзор не намалява достойнствата на представения труд, а представлява една добра основа за автори, които проявяват интерес за изследване в тази област. Искам да подчертая, че авторката отлично се е справила с техническите трудности при провеждането на експериментите, отлично владее методите и обсъжда критично резултатите от нейния многогодишен упорит труд.

В резултат на гореизложеното, с пълна убеденост препоръчвам на уважаемото жури да присъди на д-р Пенчева образователната и научната степен „Доктор“ в професионално направление – Медицина, научната специалност: Анатомия, хистология и цитология .

04.07.2014, София

Изготвил Рецензията:

