

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Калина Иванова Рачева на тема " ВРЕМЕВИ И ПРОСТРАНСТВЕНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЗРЕНИЕТО ПРИ ИЗБИРАТЕЛНА СТИМУЛАЦИЯ НА КЪСОВЪЛНОВИТЕ ФОТОРЕЦЕПТОРИ У ЧОВЕКА" за присъждане на образователната и научна степен "ДОКТОР"

от доц. д-р Петя Купенова, д.м.

Представеният дисертационен труд е развит в обем от 125 страници, текстът е структуриран в следните раздели: въведение, литературен обзор, цел и задачи, методика, експерименти: методика, резултати и обсъждане на отделните експерименти, заключение, изводи, справка за приносите на дисертационния труд, литература и приложения. Текстът е онагледен с 27 фигури и съдържа библиографска справка от 153 заглавия от периода 1948-2010г., като 8% от заглавията са след 2005 г. Съдържа справка за приносите на дисертационния труд, списък на публикациите, свързани с дисертацията и списък на цитиранията на тези публикации.

ТЕМАТА на дисертационния труд е актуална. Въпреки че зрителната система отдавна е обект на интензивни изследвания, в познанието ни за зрителните механизми, свързани със стимулация на късовълновите рецептори (S-колбичките) има значителни празноти. Независимо от своята малобройност (около 7-8% от популацията на колбичките), S-колбичките и свързаните с тях невронални мрежи играят важна роля в зрителната функция, особено в механизмите на цветното зрение. Именно малкият брой, обаче, на S-колбичките и съответно нелеката идентификация на ретиналните неврони, получаващи специфичен вход от тях, затрудняват изследването на тези механизми. Все още недобре изяснени са, например, неврофизиологичните механизми за получаване на синьо/жълтата опонентност при зрителните отговори, както и участието на ON и OFF канала в зрителната система във формиране на тази опонентност. Изясняването на тези въпроси е от фундаментално значение за разбиране на механизмите на цветното кодиране. За медицинската практика изучаването на зрителните отговори с вход от късовълновите колбички има важно значение за ранната диагностика на някои социално значими заболявания като например глаукома, ранен признак при която е повишаването на прага на отговорите на късовълновите колбички. Зрителните отговори, получени при стимулация на S-колбичките, са от години обект на изследване в изследователското звено "Преработка на зрителната информация" към Института по невробиология при БАН. Разработени са оригинални експериментални постановки и са постигнати значими научни резултати относно характеристиките на тези отговори. В настоящият труд са представени и обобщени данните, получени с активното участие на дисертантката.

Във ВЪВЕДЕНИЕТО вниманието се насочва към съществуването в зрителната система на два основни канала за преработка на зрителните сигнали - ON и OFF канал, преработващи съответно информация за светлинни инкременти и декременти. Посочва се, че сегрегацията на сигналите, постъпващи от късовълновите колбички по ON и OFF канала е засега по-слабо изяснена, което мотивира докторантката да внесе повече яснота по този въпрос, базирайки се на изследване с психофизични методи на пространствените и времеви характеристики на механизмите за откриване на инкрементни и декрементни стимули в условия на изолирана селективна стимулация на късовълновите колбички.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е представен на 36 страници. В началото на обзора са представени особеностите на S-колбичките и техните пътища. Представена е общата схема на предаването на сигналите в ретината по пътя фоторецептор-биполярна клетка-

ганглийна клетка, като е посочен начинът на формиране на ON и OFF каналите на нивото на синаптичното предаване между фоторецепторите и биполярните клетки. Представени са латералните взаимодействия в двата плексиформени слоя с участие на хоризонталните и амакринните клетки. Разгледани са различните групи биполярни и ганглийни клетки със специален акцент върху ON/OFF дихотомията, като е акцентирано върху съществуващата значителна ON/OFF асиметрия на клетките с вход от S-колбичките, за разлика от клетките с вход от другите видове колбички. В обзора са представени основните морфологични групи ганглийни клетки, техните основни фоторецепторни входове, големината и разпределението на техните дендритни дървета в ON и OFF подслоеве на вътрешния плексиформен слой и проекциите им в латералното коленчато тяло. Дадено е подробно описание на най-добре проучения вид ганглийни клетки с вход от S-колбичките – малките двуслойни ганглийни клетки (МДГК) и техните фоторецепторни входове. Представени са хипотезите за организацията на техните рецептивни полета. Тук биха могли да се добавят някои съвсем нови данни, директно потвърждаващи модела за директни коекстензивни входове от S-ON- и (M+L)-OFF –биполярни клетки, показващи също неучастието на основните задръжни медиаторни системи за формиране на основните характеристики на рецептивните полета на МДГК, както и значението на синьо/жълтата опонентност, формирана на нивото на S-колбичките за формиране на характеристиките на рецептивните полета на тези клетки. (Crook et al, 2009, J Neurosci, 29(26):8372-8387; Packer et al, 2010, 30(2):568-572). Заслужават малко по-голямо внимание и данните за организацията на фоторецепторните входове и стратификацията на дендритните им дървета във вътрешния плексиформен слой на големите двуслойни ганглийни клетки и големите (large sparse) еднослойни клетки, описани в работата на Dacey & Packer (2003), която е цитирана в литературната справка. Данните за големината и организацията на рецептивните полета с вход от S-колбичките са от голяма важност от гледна точка на поставените експериментални задачи и тълкуването на експерименталните данни. В края на този раздел на обзора са упоменати данни от психофизиологични изследвания, показващи намаляването до изчезване на ON/OFF асиметрията на нивото на зрителната кора. Смятам, че едно удачно допълнение към тази част на обзора би било цитирането и на данни, получени чрез изследване на сумарни електрични отговори като ЕРГ. Например, в съзвучие с показаната за единични клетки по-голяма ON/OFF асиметрия на по-дисталните нива в зрителната система, в конвенционалната ЕРГ, която отразява предимно активността на биполярните клетки, е намерената липса на позитивен OFF-отговор (d-вълна) в отговор на селективна стимулация на S-колбичките (напр. Evers & Gouras, 1986, Vision Res., 26:245-254), докато в структурираната (pattern) ЕРГ, отразяваща в по-голяма степен активността на ганглийните клетки, стимулацията на S-колбичките дава както ON- така и позитивен OFF-отговор (d-вълна) (Zolnikova et al., ISCEV 1998). В електроретинографските записи добре проличават и разликите във времевите характеристики на отговорите, медириани от S-колбичките и от другите видове колбички. По-нататък в литературния обзор са представени спектралните характеристики на трите вида колбички при човека и два метода за тяхната селективна стимулация. Тук са посочени основанията за избора в експериментите да бъде използван двуцветният метод на Stiles. В следващия раздел на обзора е описана пространствената сумация в зрителната система, отразяваща нейната способност да сумира кванти от дадена площ. Представени са видовете пространствена сумация: пълна, непълна и свръхсумация и законите, които ги описват. Направено е пояснение за зоната на пълна пространствена сумация (критичен размер или "зона на Рико"), която е и един от параметрите, обект на изследване в дисертацията. Посочена е корелацията

между размера на зоната на Рико и размерите на централната зона на рецептивните полета на ганглийните клетки. Тази зависимост стои до голяма степен и в основата на поставените експериментални задачи, тъй като е много вероятно в случай че чрез използване на психофизични методи се намерят механизми, различаващи се по големината на критичния размер, тези механизми да имат като неврофизиологичен корелат различен вид ганглийни клетки, с различна големина на рецептивните си полета. Показани са няколко метода за изследване и представяне на механизма на пълна сумация, един от които е използван по-нататък при провеждане на експериментите, представени в настоящия труд. В тази част на обзора е отделено внимание и на различни фактори, които повлияват механизма на пространствена сумация и размера на зоната на Рико като интензитет и спектрален състав на фона, продължителност на стимула, възможностите за сумация и латерално задържане в различните части на рецептивното поле, припокриването на рецептивните полета, свойствата на реалните детектори на кванти – квантова ефективност, време на интеграция, възможност за различаване на стимула от шума създаден при съответни нива на фонова яркост, площ и времетраене на стимула. Познаването на тези фактори е от значение за избиране в експерименталната постановка на оптимални параметри на стимулация, позволяващи еднозначно тълкуване на получените резултати. В последната част на обзора е направена съпоставка на едноканалния и двуканалния модели за откриване на инкрементни и декрементни зрителни стимули. Въпросът за кодирането на сигнали посредством механизми, способни да отговарят на противоположни полярности на параметрите на кодираните признаци, или чрез механизми, селективни към промяна на стойностите на параметрите само в една посока, е кардинален за разбирането ни за работата на нервната система въобще. Пример за двуполусен детектор е, например, клетка, проявяваща базална спонтанна активност, която може да бъде модулирана както в (+) така и в (-) посока, докато пример за използване на еднopolюсни детектори е, например, паралелното съществуване на ON и OFF клетки (два канала), специализирани да кодират съответно промени, насочени към единия или другия полюс. В обзора са посочени модели за обработка на информация с използване на двуполюсни и еднopolюсни механизми и предимствата и недостатъците по принцип при използване на двата вида механизми. Има достатъчно основание да се допусне, че в нервната система се използват предимствата и на двата типа кодиране при решаване на различни задачи. В конкретния случай трябва да бъде намерен отговор дали кодирането на сигналите в синьо/жълтия опонентен механизъм, който е един от основните механизми, участващи в цветната дискриминация, се извършва с участието на един двуполусен или два еднopolюсни механизма. Литературните данни са противоречиви. Трудността да бъдат намерени S-OFF биполярни клетки е аргумент в полза на двуполусен (едноканален) механизъм, използващ само ON канала в дисталните нива на зрителната система. В същото време инкрементните и декрементните отговори, получени чрез различни техники за селективно дразнене на ON или OFF канала при изолация на S-колбичков вход, показват асиметрия по отношение на чувствителността, времевите и пространствените си характеристики, което подкрепя съществуването на два еднopolюсни механизма (два канала). В подкрепа на двуканалния модел е и липсата на селективно намаление на чувствителността в късовълновата област след блокиране на сигналите от ON биполярите с APB (в текста е допусната неточност – че APB блокира въобще ON отговорите). В обзора са цитирани данни както от електрофизиологични изследвания на корова активност, така и от изследвания с психофизични методи. Показани са и противоречията в резултатите на различни автори. Това обосновава необходимостта от натрупване на нови данни за изясняването на този кардинален за

механизмите на цветното зрение въпрос, като се набелязват и типове задачи, които биха помогнали за това.

ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ на изследването произтичат логично от данните, представени в литературния обзор. Получаването на нови данни за съществуването на S-ON и S-OFF пътища чрез съпоставка на данни от психофизични изследвания с характеристиките на ретиналните невронални мрежи би имало значителен принос за разбирането ни на механизмите на цветното кодиране. Постановката на задачите съответства на поставената цел. Забележката ми към този раздел е, че при дефиниране на целта се упоменава изключително необходимостта от допълнително изследване на пространствените характеристики на инкрементните и декрементни отговори, докато заглавието на дисертацията предполага и изследване на техните времеви характеристики. Разбира се, прегледът на задачите показва, че тези характеристики също влизат в обсега на изследването.

В главата МЕТОДИКА е направено подробно описание на експерименталната постановка. За получаване на стимули, селективни за S-колбичките е използвана оригинална модификация на двуцветния метод на Stiles, разработена в лабораторията по идея на проф. А. Василев. Според класическия метод на Stiles изолирана стимулация на S-колбичките може да се получи чрез хроматична адаптация на M- и L-колбичките с ярка (насищаща ги) жълта светлина. Това би дало, обаче, възможност да бъдат изследвани само инкрементни отговори. При оригиналната модификация на Василев към яркия жълт фон се добавя малка постоянна късовълнова съставка, позволяваща чрез промени в нейния интензитет да бъдат получавани както инкрементни, така и декрементни отговори. Параметрите на стимулация, използвани в настоящия труд са подбрани подходящо. Направена е верификация за насищането на M- и L- механизма, чрез тестване на праговете при нарастваща яркост на фона. Направена е и верификация за това, че тестовите стимули стимулират само S-колбичките чрез изследване на спектралната чувствителност на отговорите и съпоставка на получената крива с кривата на спектрална чувствителност на S-колбичките ($\pi 1$ механизъм на Stiles). За съжаление, всички други части на методиката не са разгледани в някакъв по-общ вид тук, а единствено на местата в следващия раздел, където е описано изпълнението на конкретните задачи. Смятам ,че би било добре тук да бъдат представени основните използвани методи за определяне на прагове и реакционно време, статистическа обработка на данните, използваните апроксимации и тяхната оценка – например билинейната апроксимация по метода на Vogartz и доколко добра е била тази апроксимация (goodness of fit).

ЕКСПЕРИМЕНТИ: МЕТОДИКА, РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ. Намирам за удачно представянето на резултатите и обсъждането на едно място, което улеснява интерпретацията на получените данни и помага за извеждане на оригиналните приноси. В експеримент 1 е изследвана пространствената сумация за инкрементни и декрементни стимули с различен ексцентрицитет. Намерено е, че близо до фовеата праговете за инкременти са близки, но все пак малко по-големи от тези за декременти. За разлика от това в ретиналната периферия праговете за малки декрементни стимули стават по-високи от тези за инкрементните, като, обаче, намаляват по-силно с нарастване на площта на стимула, което говори за по-голяма ефективност на пространствената сумация при декрементните отговори в тази част на ретината. Различната зависимост на прага от площта при инкременти и декременти в периферните зони е в полза на хипотезата за различни пътища, в които става тази сумация. Изключително интересен е резултатът от сравнителното изследване на промените на зоните на Рико с ексцентрицитета при инкрементни и декрементни стимули. Намерено е, че зоните на Рико за стимулни инкременти и декременти са с

приблизително еднакви размери при малките ексцентрицитети. И за двата вида стимули тези зони нарастват с ексцентрицитета, но това нарастване е по-стръмно при декрементните отговори, така че в по-периферните части на ретината зоната на Рико е значително по-голяма за декрементните, в сравнение с инкрементните отговори. Най-голям интерес във връзка с дефинираната в дисертационния труд задача представлява сравняването на зоните на Рико за инкрементни и декрементни стимули с големината на рецептивните полета и плътността на МДГК, за които се знае, че имат вход от S-колбичките. Макар размерите на рецептивните полета на тези клетки да нарастват с ексцентрицитета, а плътността им да намалява, нарастването с ексцентрицитета на големината на рецептивните полета на МДГК изостава в сравнение с нарастването на зоните на Рико, като разликата е значително по-малка при инкрементните отговори отколкото при декрементните отговори. Обсъдени са няколко възможни причини за това. Възможността за реорганизация на рецептивните полета посредством латерални взаимодействия с участието на амакринни клетки изглежда според мен твърде малко вероятна предвид новополучените данни за липса на такава реорганизация при фармакологично блокиране на основните латерални взаимодействия във вътрешния плексиформен слой (Crook et al, 2009, J Neurosci, 29(26):8372-8387). Много по-вероятна изглежда възможността за участието освен на МДГК и на други клетки, притежаващи по-големи рецептивни полета. От тях са споменати големите двуслойни ганглийни клетки, притежаващи организация на рецептивните полета, сходна с тази на МДГК, други клетки са обсъдени по-нататък в раздел «Заклучение». Като цяло резултатите от експеримент 1 имат приносен характер и са в подкрепа на двуканалния модел, описан в обзора. В експеримент 2 основната задача е била да се верифицира селективната стимулация на ON – или OFF- канала при включване на инкрементни и декрементни стимули с кратка продължителност, от типа на използваните в задача 1, тъй като изключването на всеки от тях би могло да представлява стимул за противоположния канал. Отговорът на този въпрос е от значение както за тълкуването на резултатите от предишната задача, така и за практиката на психофизиологичните изследвания с такива стимули въобще. За целта е проучена промяната в праговете на инкрементни и декрементни трионовидни стимули със стръмен преден или заден фронт и с продължителност, равна на тази на импулсните стимули. Резултатите от този експеримент имат приносен характер и доказват, че зрителната система е по-чувствителна към включването отколкото към изключването на кратки правоъгълни стимули, независимо от техния знак - инкрементни или декрементни, което е и доказателство за верността на изводите, направени в обсъждането на задача 1. Поради неголямата разлика в чувствителността към включване и изключване на стимулите, допълнително изследване на чувствителността към включване и изключване на околопрагови инкрементни и декрементни стимули е направено при друга опитна постановка в проведения Експеримент 3. В този експеримент е изследвано разпределението на реакционните времена при включване и изключване на околопрагови инкрементни и декрементни стимули, селективно дразнещи S-колбичките, с променлива продължителност - от 500 до 2000 мсек. Ефектите от очни движения и акомодация са избегнати с използване на големи стимули с размер равен на фона. Установено е мономодално разпределение на реакционните времена при по-кратките стимули (реакция само на включването), което става бимодално при удължаване на стимулите (реакция както на включване, така и на изключване), като чувствителността към изключване на стимулите нараства с тяхната продължителност. Същевременно при ахроматични стимули разпределението и винаги бимодално. Ниската чувствителност към изключване на кратки хроматични стимули, селективни за S системата, е съпоставена и корелира с данни, получени при изследване на корови

евокирани потенциали. Относителното разпределение на времената на реакция при включване на кратки стимули (с мономодално разпределение) и по-дълги стимули (с бимодално разпределение) не показва съществени различия и отговорите не могат да се причислят към тоничния тип отговори. С този експеримент отново се потвърждава, че в опитите с кратки правоъгълни инкрементни и декрементни стимули чувствителността е по-голяма при включване на стимулите и съответно селективно се стимулират ON- и OFF- каналите, но се изявяват и други характеристики на отговорите на стимулация на S-колбичките - техните времеви характеристики. Ниската чувствителност при изключване на краткотрайни стимули, селективни за S-колбичките, се обяснява с това, че тази система има по-бавна кинетика (по-голяма времеконстанта) на отговорите, а освен това показва по-бавна адаптация при хроматична пертурбация. В експеримент 4 е направена проверка за времеви интервал, в който все още се проявява по-ниската чувствителност за изключване на отговора в условията на изследване на пространствената сумация с малки стимули, локализирани в ретиналната периферия. За съжаление при тази опитна постановка не могат да се премахнат фазичните преходни процеси на границата между фона и стимула, генерирани от очните движения. Показано е, че разликата в праговете за инкрементни и декрементни стимули изчезва при продължителности 400-500 мсек., а в рамките на това време има статистически достоверно взаимодействие между фактора поляризираност (инкремент или декремент) и продължителност на стимула.

В главата ЗАКЛЮЧЕНИЕ се прави обобщение на експерименталните резултати и се посочва основният извод, базиран на тях, а именно за съществуването на два еднополюсни механизма в синьо/жълтия канал на Херинг, които показват различни пространствено-времеви характеристики, поне в ретиналната периферия, и са в подкрепа на идеята и на други автори за необходимост от преразглеждане на теорията на Херинг за цветното зрение.

Съгласна съм с основните изводи и справката за научните приноси на дисертационния труд.

Авторефератът отразява основните научни резултати и е оформен според приетите изисквания.

Материалите, свързани с дисертацията са публикувани в три статии, всичките с импакт фактор, и седем научни форума, като за единия от тях материалът е публикуван в пълен вид в Интернет. В почти всички статии и участия дисертантката е първи автор. Заслужава да се отбележи, че две от статиите са публикувани в авторитетното списание Vision Research. Посочени са тринадесет цитирания от други автори и то в списания като Visual Neuroscience, Vision Research, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Journal of Neuroscience, Journal of Vision, Journal of Physiology, както и в Handbook of optics, публикуван под егидата на Американското дружество по оптика, което представлява своеобразна международна оценка на значимостта на научните изследвания, представени в дисертационния труд.

В заключение, смятам, че дисертационният труд на Калина Иванова Рачева представлява едно задълбочено изследване на пространствените и времеви характеристики на зрителните отговори при стимулация на късовълновите рецептори, със свои оригинални приноси, допринасящи за разбирането на основни механизми в работата на зрителната система. Предлагам убедено на научното жури да присъди на Калина Иванова Рачева образователната и научна степен „ДОКТОР“.

14.04.2011
София

Рецензент:


/доц. д-р Петя Купенова, д.м./