

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФ. Д-Р НИКОЛАЙ ЕЛЕНКОВ ЛАЗАРОВ, Д.М.Н.
ВЪРХУ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ
НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”
ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ “АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЦИТОЛОГИЯ”

АВТОР НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: ДИМО СТОЯНОВ СТОЯНОВ
ТЕМА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: „РОЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР Zbtb20
В РАЗВИТИЕТО НА ИНТЕРНЕВРОНИ В КРАЙНОМОЗЪЧНА КОРА НА МИШКА”
НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р АНТОН БОЖИДАРОВ ТОНЧЕВ, Д.М.Н.

Димо Стоянов Стоянов е асистент в катедрата по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет (МУ) „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна. От 2021 година той притежава права на специалист по научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“. През 2018 година Димо Стоянов година е зачислен (със заповед № Р-109-17/15.01.2018 г.) за докторант в редовна форма на обучение по докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“ към същата катедра, където е провел основната част от експериментите по настоящата дисертация. След приключване на програмата за обучение и успешно положен изпит за докторски минимум по научната специалност, със Заповед № Р-109-481/14.12.2022 г. на Ректора на МУ-Варна той е отчислен, съгласно решение на Факултетния съвет на факултет „Медицина” по протокол № 77/05.12.2022 г., с право на защита пред научно жури.

Дисертационният труд на тема „*Роля на транскрипционен фактор Zbtb20 в развитието на интерневрони в крайномозъчна кора на мишка*” е написан на 119 стандартни страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Титулна страница, Съдържание* – 2 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 40 стр., *Материал и методи* – 8 стр., *Резултати* – 38 стр., *Дискусия* – 8 стр., *Заклучение* – 1 стр., *Изводи* – 1 стр., *Справка за приносите* – 1 стр., *Публикации и участия в научни форуми* – 1 стр., *Списък на използваните съкращения* – 2 стр., *Благодарности* – 1 стр., *Литература* – 13 стр., включваща 160 заглавия, всичките на латиница. Собствените резултати са онагледени с 34 фигури, повечето от които представляват табла с поредица от монтирани микрофотографии, така че действителният брой на представената фотодокументация е значително по-голям. Освен това, в литературния обзор и раздела M&Ms са включени още 11 фигури (с посочен оригинален източник) и 3 таблици, които подкрепят историографските данни и нагледно илюстрират използваните методи, антителиа и реагенти.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на един социалнозначим и изключително актуален проблем на фундаменталната невробиология – ембрионална и адултна неврогенеза. Въпреки че в последните две десетилетия молекулярните механизми, които регулират процеса на кортикогенеза в крайния мозък у гризачи и примати са предмет на интензивни изследвания, все още се знае относително малко за детайлните контролни механизми на този процес при човек, вкл. за функционалното значение на транскрипционните фактори, регулиращи пролиферацията, миграцията и диференциацията на кортикалните интерневрони. В този смисъл докторантът си е поставил амбициозната задача да установи ефекта на един транскрипционен фактор, *Zbtb20*, върху генерирането и развитието на интерневроните в крайномозъчната кора и да сравни модела на негова експресия в субпалиума на миши и човешки мозък. С оглед на известната понастоящем зависимост между дисрегулацията в експресията на *Zbtb20* и етиопатогенезата на някои невропсихични разстройства с голяма социална значимост, изясняването на потенциалното функционално значение на този транскрипционен фактор за нормалното развитие на кортикалните интерневрони би допринесло за разработване на нови ефективни терапевтични подходи при тези заболявания.

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

Литературният обзор е подробен и дава в тематично обособени подраздели обширна информация за ембрионалното развитие на вентралния краен мозък при бозайници и за молекулярния контрол на формиране на субпалиума, стволовата клетъчна ниша в мозъка, класификацията на кортикалните интерневрони, техния произход и миграция в крайномозъчната кора. Представена е в детайли молекулярната класификация на кортикалните интерневрони във възрастни животни. Приведени са изчерпателни данни за генетичната структура на *Zbtb20*, неговата експресия в ЦНС и ПНС, както и за връзката между нарушената му фенотипна експресия при някои невропсихиатрични заболявания. Литературните данни са подходящо илюстрирани с фигури и схематични рисунки от текущата периодика. От цитираните литературни източници повече от половината са публикувани през последното десетилетие, вкл. 3 статии след 2020 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 дисертанта по него. Би било добре обаче, прегледът на литературата да завърши с отделен раздел или поне с един заключителен параграф, в който в резюмиран вид да се направи кратко обобщение на наличната по темата информация, а конкретните изводи от анализа на текущото състояние на разглеждания проблем да послужат за солидна основа за изграждане на адекватна работна хипотеза на изследването.

Разделът „**Материал и методи**“ е сравнително кратък, но достатъчно изчерпателен. Спазени са националните етични изисквания на Германия при работа с животински материал за експериментални цели, откъдето, очевидно, са получени опитните животни. Общият брой на експерименталните животни не е посочен, но аз приемам априори че взетите тъканни проби са напълно достатъчни за постигане на статистически достоверни резултати. Описанието на следваните протоколи при имунохистохимичните и хибридохистохимични реакции, анализът на дигитализираните микроснимки и проведения 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 реактиви, първични и вторични антитела, гостоприемника и работните им разреждания са дадени в прегледни таблици. В текста липсва обаче задължителното описание на приложените контролни оцветявания, които са от критична важност за специфичността на всяка имунохистохимична реакция. Също така, не е цитиран коректно използвания за статистическата обработка софтуер.

Разделът „**Резултати**“ е изложен в приблизително една трета от общия обем на дисертацията. Той е разделен описателно на подраздели, но по мое мнение тяхното формулиране не е особено удачно от научна гледна точка. С помощта на широк панел от молекулярни маркери, разграничаващи отделните субпопулации кортикални интерневрони, последователно са обрисувани моделите на разпределение, гъстотата и фенотипа на Zbtb20-позитивните невронални стволови клетки в субпалиума, описан е феномена на специфично, но незначително занижение на броя на кортикалните интерневрони в ганглионарните еминенции и липсата на промяна в процента на стволовите клетки, напускащи клетъчния цикъл в резултат на заглушена експресия на Zbtb20 и ефектите на този транскрипционен фактор върху развитието и миграцията на кортикалните интерневрони с различен произход. Прилагайки

регион неспецифични маркери, дисертантът е проследил динамиката в тяхната експресия и не е установил различия в клетъчната гъстота на имунопозитивните интерневрони в отделните кортикални слоеве. Приведени са конкретни експериментални данни за отсъствие на засилена постнатална клетъчна смърт при хомозиготни мутанти и за липса на преждевременна диференциация на интерневроналните прогенитори в субпалиума на *Zbtb20*^{-/-} мишки. В същото време, Стоянов демонстрира дефектна пролиферация в ранните стадии на развитието им при мутантите и регистрира нарушена времева динамика при генерирането на кортикални интерневрони. Чрез статистически анализ с подходящ софтуер той е документирал сигнификантност на получените данни.

Специално отбелязване заслужава факта, че всички авторски находки са подкрепени от достатъчен илюстративен материал под формата на схеми и микроснимки с високо качество. От друга страна, статистическите данни, представени като графики и хистограми, дават богата и прегледна информация за установените количествени показатели в броя и процентното съотношение на имунопозитивните клетки.

Дискусията е не особено пространна, предвид на уклона на докторанта, обясним с неговата неопитност, да обсъжда на места в предишния раздел своите находки, наред с тяхното описание. Независимо от това дискусията е много добре написана и показва завидното умение на дисертанта за обсъждане на собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в релевантната литература, и интерпретирайки ги адекватно да направи важни изводи за фенотипа на новогенерираните кортикални интерневрони, и потенциалното значение на тези данни за клиничната практика. Наред с това, анализът на имунохистохимично/хибридохистохимично верифицираните субпопулации кортикални интерневрони е особено ценен в аспекта на невrogenезата. Определен практически интерес има също така дискусията за конкретната роля на занижените пролиферативни нива в ранните етапи на невrogenеза и нарушената последователност на послойното генериране на кортикалните интерневрони в ганглинарните еминенции на субпалиума за изясняване на механизмите на отклонения от нормалното им развитие в неокортекса. Силно впечатление прави също така изказаното предположение за хипотетичното участие на *Zbtb20* в генетичната регулация на субпалиума. За съжаление на този етап тази идея е само загатната и предстои да бъде потвърдена в бъдещи проучвания, каквато насока е подсказана в заключителните бележки на дисертационния труд.

Задълбоченото обсъждане на получените данни, независимо от някои недостатъци на експерименталната процедура, е послужило на докторанта за добра основа за прецизно формулиране на **изводите** от настоящото проучване. Те са конкретни, написани са стегнато, с изключение донякъде на втория извод, и точно отразяват авторските заключения, произтичащи от натрупаните нови данни. Като цяло приемам, с горепосочената единствена забележка, тяхната формулировка и научна стойност. Научните постижения на дисертанта в настоящето изследване са изведени в отделен раздел под формата на кратка справка.

Основните приноси на дисертационния труд, които имат определен оригинален характер, биха могли да се резюмират както следва:

1. Настоящото проучване е първото си по рода детайлно проучване на ефектите на транскрипционния фактор *Zbtb20* върху съдбата на новогенерираните интерневрони в крайномозъчната кора.
2. За пръв път експериментално се демонстрира експресията на *Zbtb20* на ниво иРНК/протеин в субпалиума на мишки и хора.
3. Приведени са оригинални данни за влиянието на *Zbtb20* върху кортикалните интерневрони и ефекта на заглушената му експресия в прогениторните им зони.
4. Дадени са ценни практически насоки за вероятна връзка между експресионните нива на *Zbtb20* и етиопатогенезата на някои невропсихични нарушения, и е подсказано потенциалното им значение за разработване на нови терапевтични подходи за тях.

В приложената документация е налице декларация за оригиналност на разработката, което ми дава основание да приема, че настоящият дисертационен труд е лично дело на д-р Димо Стоянов. Допълнителен аргумент за тази констатация са представените от автора научни публикации и съобщения по темата с негово участие. Резултатите от експериментите са отразени в 3 публикации в реферирани научни списания, една от които е публикувана в списание с импакт фактор, попадащо в Q2 категория. В две от тях, вкл. в последната статия, Стоянов е първи съавтор. Справката в Scopus показва, че до този момент една от тези статии е получила едно цитиране в международната периодика, най-вероятно поради факта, че те са публикувани неотдавна. С оглед на актуалността на разглеждания научен проблем и оригиналността на получените резултати, обаче аз съм убеден, че тези разработки в бъдеще ще получат подобаващо международно признание.

Дисертацията е написана ясно, на разбираем научен език и стил на изложението, забелязват се само единични правописни и/или стилистични грешки. Използвани са обаче сравнително голям брой специфични термини и съкращения с техните английски абривиатури, което донякъде затруднява непрофесионалния читател при нейния прочит. 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.

Към дисертационния труд имам и някои критични бележки, предимно насочени към неговото оформление, което следва модела на структуриране на научна статия. На първо място нито в самия дисертационен труд, нито в неговия автореферат е посочена, и то както е общоприето в отделен раздел, целта на изследването, а задачите за нейното постигане са споменати при описанието на собствените резултати. Списъкът на използваните в труда съкращения, голямата част от които са специфични термини, би следвало да е в началото, а не в края на текста, разположен между публикациите на автора и благодарностите. Така и незапознатия с тематиката читател ще може да се ориентира по-добре и по-лесно да вникне в смисъла на изложението. По мое мнение, формулирането в Раздела „Материали и методи“ на подраздел 2.б., озаглавен „Изброяване“ е неудачно и следва да се замени с научен термин като напр. „Количествен анализ ...“. Същото се отнася и до повечето подзаглавия в Раздела „Резултати“. На рецензента не прави добро впечатление и факта, че отделни латински термини (като напр. *In situ*) са транслитерирани с български букви. Добре би било също така, латинските термини да бъдат изписвани с курсив. Освен това, мястото на библиографските източници (някои непълно цитирани) е непосредствено след същинския текст, веднага след заключението и изводите, и преди допълнителната информация за приносите на дисертационния труд, публикациите във връзка с него и благодарностите. Накрая, но не на последно място, добавянето на едно кратко резюме на дисертационния труд на английски език без съмнение би повишило международната му разпознаваемост в чуждата периодика. Тези технически недостатъци обаче не намаляват в никаква степен научната стойност на този труд.

В заключение считам, че дисертационният труд на д-р Димо Стоянов е едно комплексно и задълбочено проучване върху интересен и актуален проблем на съвременната невробиология. 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 кортикалната неврогенеза. Резултатите от изследването внасят оригинален и значим теоретично-приложен принос за изясняване на факторите и механизмите на нормалното развитие на интерневроните в неокортекса, влиянието на *Zbtb20* гена върху гъстотата на интерневроналната популация и връзката на експресионния му индекс с регулаторните пътища на диференциация на субпалиума. Без съмнение, съществен принос за успешната реализация на този труд има и компетентното научно ръководство на научния ръководител на докторанта проф. Антон Тончев, който е изявен специалист в областта на неврогенезата. Представеният труд отговаря на изискванията за придобиване на научно-образователната степен 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 „Анатомия, хистология и цитология“ на Димо Стоянов.

Рецензент:

(проф. д-р Николай Лазаров, д.м.н.)

11.01.2023 год.
гр. София