

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”
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 7.1. МЕДИЦИНА

АВТОР НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: МАРТИН НИКОЛАЕВ ИВАНОВ

**ТЕМА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: „ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА
ПРОГЕНИТОРНИ КЛЕТКИ В СУБВЕНТРИКУЛАРНАТА ЗОНА ОТ КРАЙНИЯ
МОЗЪК НА ВЪЗРАСТНИ ПРИМАТИ“**

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р СТОЯН ПАВЛОВ ПАВЛОВ, Д.М.

Мартин Иванов е асистент в катедрата по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет (МУ) „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна. От 01.06.2023 година той притежава права на специалист по научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“, видно от приложеното свидетелство за призната специалност. През 2019 година д-р Иванов е зачислен (със Заповед № Р-109-81/01.02.2019 г.) за докторант в редовна форма на обучение по докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“ към същата катедра, където е проведена основната част от експериментите по настоящата дисертация. След приключване на програмата за обучение и успешно положени изпити за докторски минимум по научната специалност и чужд език, със Заповед № Р-109-469/09.11.2023 г. на Ректора на МУ-Варна той е отчислен, съгласно решение на Факултетния съвет на факултет „Медицина”, взето с протокол № 11/23.10.2023 г., с право на защита пред научно жури, определено със същата заповед.

Дисертационният труд на тема „*Пролиферация и диференциация на прогениторни клетки в субвентрикуларната зона от крайния мозък на възрастни примати*” е написан на 147 стандартни страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Титулна страница*, *Съдържание* – 3 стр., *Посвещение* – 1 стр., *Списък на използваните съкращения* – 3 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 18 стр., *Цел и задачи* – 2 стр., *Материал и методи* – 29 стр., *Резултати* – 51 стр., *Обсъждане* – 15 стр., *Недостатъци на проучването* – 2 стр., *Заклучение* – 1 стр., *Изводи* – 1 стр., *Справка за приноса на труда* – 1 стр., *Публикации и доклади във връзка с докторантурата* – 2 стр., *Библиография* – 14 стр., включваща 179 заглавия, едно – на кирилица и 178 на латиница, *Благодарности* – 1 стр. Собствените резултати са онагледени с 46

фигури, повечето от които представляват табла с поредица от монтирани микрофотографии и диаграми, така че действителният брой на представената фотодокументация е значително по-голям. Освен това, в литературния обзор и раздела Материал и Методи са включени още 13 фигури (с посочен оригинален източник) и 3 таблици, които подкрепят историографските данни и нагледно илюстрират експерименталната процедура, приложените методи, изследваните гени, използваните антители и маркери.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на един изключително актуален проблем на фундаменталната невронаука и транслационната медицина – адултна неврогенеза. Въпреки че в последните десетилетия процесите на клетъчна пролиферация, миграция и диференциация в герминативните зони на крайния мозък на гризачи са добре проучени, все още се знае относително малко за съдбата на невралните стволови и прогениторни клетки, както и за детайлните механизми на индуцирана от исхемия неврогенеза в мозъка на примати и при човек. В този смисъл докторантът си е поставил амбициозната цел да селектира и фенотипизира кандидат гени с потенциална експресия в приматната неврогенна ниша, да изследва и сравни техните експресионни нива в един от най-добре проучените ѝ региони – субвентрикуларната зона на латералния вентрикул в крайния мозък на възрастни нетретиран японски макаци и маймуни с глобална мозъчна исхемия.

Уводът е кратък и насочен към обосновка на изследването, въвеждайки по подходящ начин читателя в предмета на дисертационния труд.

Литературният обзор е подробен и дава в тематично обособени подраздели обширна информация за неврогенезата и невроналните стволови клетки, привежда данни за строежа на субвентрикуларната зона и нейните морфологични особености при примати, за ролята на мозъчната исхемия за активиране на неврогенезата и променения транскриптом при нея, за методите и експерименталните модели за изследване на неврогенезата. Литературните данни са подходящо илюстрирани с фигури и схематични рисунки от наличната библиография. От цитираните литературни източници половината са публикувани през последното десетилетие, вкл. 19 статии от последните две години, 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. Според мен, би било удачно 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 и логичен преход към следващия раздел на труда.

Целта на изследването не е много ясно дефинирана. Вместо това, тя е пространно описана на повече от една страница, като дори включва и информация, присъща за увода и литературния обзор. **Задачите** са конкретни и правилно поставени. Може би като отделна задача би могло да се запише и извършване на образен и статистически анализ на получените данни.

Разделът „**Материал и методи**“ е обширен и достатъчно изчерпателен. В хода на изследванията е използван мозъчен материал от шест полово зрели японски макаци и аутопсионен материал от три човешки мозъка. Несъмнено този брой е недостатъчен за глобални заключения на популационно ниво, но предвид на етичните граници при изследвания с примати, той е напълно достатъчен за постигане на статистически достоверни резултати в едно отделно проучване. Експерименталните процедури са одобрени от етичната комисия на университета на Каназава, Япония, където е осъществен модела на глобална мозъчна исхемия. Мозъчната тъкан за хибридохистохимичните експерименти е предоставена от немския приматен център в Гьотинген, Германия от макаци, третирани съобразно националните етични изисквания за използване на животински материал за експериментални цели. Използването на човешки трупен материал за сравнителните изследвания е одобрено от комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) в МУ-Варна. Описанието на всички експериментални протоколи, вкл. подготовка и обработка на тъканите, проведените хирургични, имунохистохимични и хибридохистохимични процедури, както и техниките за синтез на пробите за последните, фенотипния анализ на идентифицираните гени, получаването и анализа на дигитализираните микроскопски изображения и последващия статистически анализ на данните са дадени с акуратност и стъпка-по-стъпка изчерпателност, позволяваща тяхната повторемост от други изследователи. Необходимата и пълна информация за използваните в изследванията реактиви, първични и вторични антители, производителя, гостоприемника и работните им разреждания, както и списък на изследваните гени и ползваните за тяхната визуализация праймери са дадени в прегледни таблици. В текста е представено и подробно описание с илюстрации на приложените контроли за специфичност на

хибридохистохимичните и имунохистохимични реакции, вкл. негативни и позитивни контролни оцветявания, но липсват такива за специфичност на антителата.

Разделът „**Резултати**“ е изложен върху една трета от общия обем на дисертацията. Той е разделен описателно на подраздели, но по мое мнение тяхното формулиране не е особено удачно, тъй като в този раздел се посочват конкретните резултати, свързани с експресията, градиента в експресионните нива и фенотипната характеристика на изследваните гени, а анализът на получените данни е предмет на обсъждането. Също така, в подраздел 6.1. е описан начина и критериите за селектиране на изследваните гени, а това е вече направено в предишния раздел 5.1. С помощта на нерадиоактивна *in situ* хибридизация с дигоксигенин-белязани сонди е демонстрирана експресията на Tenascin-C (TNC), Apelin Receptor (APLNR), Gap Junction Alpha-1 protein (GJA1) и CD (Cluster of Determination)38 в субвентрикуларната зона на контролни и исхемични маймуни на ниво иРНК, а чрез имунооцветяване със специфични маркери на невrogenеза е установена тяхната експресия на ниво протеин. При исхемичните животни, наблюдаваният хибридизационен сигнал е количествено оценен със софтуера CellDetekt като посилен в клетките, разположени в епендимния слой или под него, както и периваскуларно, но без видим дорзо-вентрален градиент на генна експресия. Установен е обаче отчетлив, но видово различен, ростро-каудален градиент, като в най-ростралните нива на латералния вентрикул експресионните нива на TNC, APLNR и GJA1 в субвентрикуларната зона са сравними с тези в стриатума, докато това на CD38 е най-високо в каудалните нива на субвентрикуларната зона, но е сравнително ниско в стриатума. Посредством имунохистохимични маркери за пролиферация, дисертантът е проследил клетъчната гъстота на Ki67-имунопозитивните неврони по цялата дължина на вентрикула и е установил забележимо намаляване в каудална посока. Приведени са сравнителни, вкл. статистически данни за наличие на сигнификантни ростро-каудални разлики в експресията на изследваните гени при гризачи и маймуни. Чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация и имунохистохимия е направен успешен опит за фенотипно характеризиране на субпопулациите от адултни стволови/прогениторни клетки, множествено експресиращи специфични маркери. По този начин е установено, че в интактни маймуни TNC генът маркира субпопулация от стволови клетки, APLNR, GJA1 и CD38 вероятно се експресират от спящи невронални стволови клетки, но с напредване на тяхната диференциация генната експресия намалява. При хора без съпътстваща патология апелин лигандът е налице в

глиални и/или невронални клетки от субвентрикуларната зона, а APLNR се експресира във всичките етапи на тяхната диференциация.

Всички авторски находки са подкрепени от достатъчен илюстративен материал под формата на диаграми (на Вен) и фотомикрографии с високо качество. От друга страна, статистическите данни в графичен вид дават богата и прегледна информация за установените количествени показатели в броя и процентното съотношение на белязаните клетки.

Дискусията е не особено пространна, но е 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 пролиферативните, диференциационни способности и фенотипа на стволовите/прогениторни клетки в крайномозъчната кора в исхемични условия. Определен практически интерес има също така дискусията относно диференциалната експресия на изследваните гени по ростро-каудалната ос на латералния вентрикул. В аспекта на неврогенезата, анализът на хибридохистохимично и имунохистохимично верифицираните субпопулации клетки в най-голямата неврогенна ниша при бозайници е особено ценен, тъй като е напълно вероятно исхемично индуцираната експресия на гени в невроналните стволови клетки да е показател за нивото на тяхната диференциация. Разбира се, тези данни трябва да бъдат потвърдени от транскриптомни изследвания върху изолирани невронални стволови клетки в приматен мозък. Бъдещи проучвания на механизмите на участие на изследваните гени на молекулярно ниво, каквато насока е подсказана в заключителните бележки на дисертационния труд, биха изяснили възможното приложение на получените данни в разработване на заместителни клетъчни терапии за заболявания, протичащи с невронална смърт.

Независимо от някои обективни недостатъци на настоящото проучване, коректно посочени и дискутирани в края на текста, получените данни и задълбоченото им обсъждане от докторанта са послужили за добра основа за прецизно формулиране на **изводите** от него. Те са конкретни, информативни, лаконично и точно отразяват авторските заключения, произтичащи от получените нови данни. Като цяло приемам тяхната формулировка, достоверност и научна стойност. Научните постижения на изследването са изведени от дисертанта 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 по рода си детайлно изследване на генна експресия в най-голямата неврогенна ниша на приматен мозък в условията на глобална мозъчна исхемия.
2. За пръв път експериментално се демонстрира експресия на Tenascin-C, Apelin Receptor, Gap Junction Alpha-1 protein и CD (Cluster of Determination) 38 на ниво иРНК/протеин в субвентрикуларната зона на латералния мозъчен вентрикул при възрастни примати.
3. Приведени са оригинални данни за ростро-каудален градиент и видови различия в генната експресия при нисши (гризачи) и висши (маймуни) бозайници.
4. Разработката притежава пионерен характер, тъй като направеното фенотипно характеризиране на невроналните стволови клетки в субвентрикуларната зона на нечовекоподобни маймуни и човек би могло да послужи за разработване на ефективна заместителна клетъчна терапия при някои невродегенеративни и психични заболявания.

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 Мартин Иванов. Допълнителен аргумент за тази моя констатация са представените от автора научни публикации и съобщения по темата на дисертацията с негово участие. Резултатите от експериментите са отразени в две публикации в реферирани научни списания, една от които е отпечатана в списание *Genes* с импакт фактор, попадащо в Q2 категория. Справката в Scopus показва, че до този момент тази статия е получила две цитирания в международната периодика, най-вероятно поради факта, че тя е публикувана неотдавна. В една от горечитираните статии Иванов е първи съавтор, а в другата той е втори съавтор. Представени са и девет научни съобщения, докладвани на наши и международни форуми, но авторският колектив на тези доклади не е посочен, което прави невъзможно конкретното определяне на персоналното участие на М. Иванов в тях.

Дисертацията е написана ясно и разбираемо, въпреки сложната за разбиране от неспециалиста материя. В текста се забелязват само единични правописни и/или стилистични грешки, но в него са използвани 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, наред с някои от горепосочените коментари, имам и единични критични бележки, предимно насочени към неудачно използване на някои термини като напр. «нормална маймуна». Освен това по мое мнение, 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 Мартин Иванов 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 адултната неврогенеза. Резултатите от изследването внасят оригинален и значим теоретично-приложен принос за изясняване на факторите и механизмите на пролиферация и диференциация на невроналните стволови клетки в крайномозъчната кора на примати, вкл. човек, на генната експресия на определени гени и връзката на променените им след исхемична увреда експресионни нива в субвентрикуларната зона с процеса на активиране на неврогенезата. Представеният труд отговаря на изискванията 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 „Анатомия, хистология и цитология“ на Мартин Николаев Иванов.

19.12.2023 год.
гр. София

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