

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова

член на научното жури, утвърдено със Заповед № Р-109-222/28.04.2025 г.
на Ректора на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

на дисертационния труд
на д-р **Искрен Боянов Великов**

на тема

„Роля на ТРАНСКРИПЦИОННИЯ ФАКТОР Zbtb20 В РАЗВИТИЕТО НА МАЛЪК МОЗЪК“

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“

в професионално направление 7.1 Медицина,

област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Научен ръководител на докторанта: проф. д-р Ирина Стоянова-Ван Дер Лаан, д.м.

Настоящото становище е изготвено с оглед публичната защита пред научно жури на представения от докторанта д-р Искрен Боянов Великов дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“. Представените материали съответстват на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна. Процедурата е спазена коректно.

I. Кратки биографични данни за докторанта

Д-р Искрен Боянов Великов е роден на 1 март 1983 г. в гр. Разград. Завършва с отличие Природоматематическата гимназия „Акад. Никола Обрешков“ в родния си град с профил „Биология с английски език“, а през 2007 г. завършва специалност „Дентална медицина“ в Медицински университет – Пловдив, също с отличие, придобивайки образователно-квалификационна степен „магистър“. След кратък клиничен стаж, от 2009 г. заема длъжност асистент в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, където води практически занятия по анатомия, хистология и ембриология на студенти по медицина, дентална медицина и фармация. През 2013 г. придобива специалност по „Анатомия, хистология и цитология“, а през 2019 г. започва редовна докторантура към катедрата по

„Анатомия и клетъчна биология“ на същия университет. Темата на дисертационния му труд е насочена към молекулярната регулация на церебеларното развитие, с акцент върху транскрипционния фактор Zbtb20. Д-р Великов владее английски език на ниво B2 с международен сертификат.

Към момента д-р Искрен Великов е член на Българското анатомично дружество, Европейската федерация по експериментална морфология (EFEM) и Международната федерация на асоциацията на анатомите (IFAA).

II. Общи впечатления и актуалност на темата

Дисертационният труд на д-р Искрен Великов прави силно впечатление със своята **научна зрялост, експериментална прецизност и концептуална обоснованост**. Изследването е резултат от системна работа, съчетаваща съвременни методи на имунофлуоресценция, количествен морфометричен анализ и критично интерпретиране на резултатите в контекста на съвременната невронаука.

Темата за ролята на транскрипционния фактор **Zbtb20 в развитието на малкия мозък** е **научно актуална и оригинална**. Макар Zbtb20 да е обект на нарастващ интерес в други мозъчни структури (напр. хипокамп, неокортекс), неговата функция в **церебеларната морфогенеза и клетъчна диференциация** е слабо изяснена. Трудът на д-р Великов запълва тази празнина и разкрива селективната глиална експресия на Zbtb20, както и неговата роля в модулиране на фолацията, популациите на клетки на Пуркиние и пролиферацията на олигодендроцити.

Съчетанието от морфологичен и молекулен подход, както и анализът на възрастово и регионално специфични ефекти, придават висока **научна стойност и новаторски характер** на изследването. Това го прави не само актуален в рамките на фундаменталната невронаука, но и **потенциално релевантен за клиничната невропатология**, където Zbtb20 се асоциира със заболявания от спектъра на невроразвитийни нарушения.

III. Структура и яснота на изложението

Дисертационният труд на тема „Роля на транскрипционния фактор Zbtb20 в развитието на малък мозък“ е написан на 142 страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Съдържание* – 3 стр., *Използвани съкращения* – 1 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 30 стр., *Цел и задачи* – 2 стр., *Материал и методи* – 3 стр., *Резултати* – 56 стр., *Обсъждане* – 16 стр., *Изводи* – 2 стр., *Приноси на дисертационния труд* – 1 стр., *Публикации и доклади във*

връзка с дисертационния труд – 1 стр., *Библиография* – 24 стр., *Благодарности* – 1 стр. включваща 254 литературни източника, всички на латиница. Трудът е онагледен с 97 фигури.

Въведението на дисертационния труд на д-р Искрен Великов изпълнява успешно своето предназначение да представи темата, нейната научна значимост и актуалност, както и основната мотивация за провеждане на изследването. То е структурирано логически, като започва с общ поглед към развитието на централната нервна система и постепенно се фокусира върху малкия мозък и неговите морфогенетични особености. Представен е кратък преглед на ролята на транскрипционните фактори, с акцент върху *Zbtb20*, който плавно води към очертаване на научния проблем.

Стилът на изложение е научен, точен и ясен, без отклонения от темата. Въведението демонстрира добра информираност по проблема и подготвя читателя за конкретните цели и задачи на дисертацията, които следват непосредствено след него. Докторантът успява да обоснове нуждата от своето изследване, като откроява недостатъчното познаване на ролята на *Zbtb20* в развитието на малкия мозък – една тема с ясно изразен иновативен и неизследван аспект.

Литературният обзор в дисертацията е изключително обстоен и систематизиран. Той предлага цялостен и задълбочен преглед на основните аспекти, свързани с развитието на малкия мозък, неврогенезата, транскрипционните фактори (особено *Zbtb20*), както и използваните клетъчни и молекулярни маркери. Структурата на обзора е логично организирана и добре съобразена с целите на изследването.

Анатомично-функционална основа (т. 2.1–2.2) Разделите за морфология, хистология и ембрионално развитие на малкия мозък са изчерпателни, с ясни анатомични и хистогенетични обяснения. Използвани са съвременни източници и са представени филогенетични и видови сравнения, което обогатява контекста.

Неврогенеза (т. 2.3) Темата е изчерпателно описана, като се акцентира на ембрионалната и постнаталната неврогенеза. Уточнено е мястото на ромбичната устна и вентрикуларната зона като източници на различни клетъчни линии. Добре се проследяват клетъчните миграции, влияние на фактори като *Shh* и роли на радиалната и Бергмановата глия.

Транскрипционни фактори (т. 2.4) Обзорът върху *Zbtb20* е най-силната част от литературния обзор – представени са структурни характеристики, функционална роля в различни органи и тъкани, ефекти от дефицита, участието в патологии и развитие. Включени са собствени анализи на ниши в съществуващата литература, които обосновават

необходимостта от настоящото изследване. Разделът за Pax2/Pax6 и други фактори като Tbr1/Tbr2 допълва разбиранията за регулация на мозъчната архитектура и предлага основа за експерименталните хипотези.

Невронални и глиални маркери (т. 2.5) Отлично систематизиране на най-често използваните маркери: BrdU, Calbindin, NeuN, GFAP, DCX и др. Изведени са основни свойства и приложения, включително ограничения и липса на данни за някои маркери в малкия мозък на Zbtb20^{-/-} мишки – това допринася за научната обосновка на дисертацията.

Разделът „**Цел и задачи**“ е структуриран ясно и точно. Докторантът първо формулира **основната научна цел**, след което изброява **девет конкретни задачи**, насочени към реализиране на тази цел. Формулировките са конкретни, реалистични и напълно съответстват на заложената изследователска насоченост.

Разделът „**Материал и методи**“ е методологично издържан, технически коректен и подходящ за възпроизвеждане. Използвани са съвременни хистологични, молекулярни и статистически подходи, напълно съвместими с целите на дисертационния труд. Разделът е подробно структуриран, последователно представен и логически обоснован. Включва всички ключови подкомпоненти: 1) вид и произход на животните (Zbtb20^{+/+}, Zbtb20^{-/-}); 2) възрастови периоди на анализ (E16, P4, P8, P12, P30); 3) хистологични и имунофлуоресцентни техники; 4) списък на използваните антитела (първични и вторични); 5) препаративни и аналитични протоколи (фиксация, криосекция, микроскопия); 6) Софтуер и статистика.

Използваният *модел на Zbtb20-knockout мишки* е адекватен и напълно отговаря на целта на изследването. Авторът използва хомозиготни мутанти, което позволява пълна блокада на функцията на Zbtb20. Включен е етичен протокол (LAVES, Германия), което показва съответствие с европейските изисквания.

Препоръка: Липсва информация за броя на използваните животни на възраст E16 и P30, докато за останалите (P4–P12) е ясно дефинирано n=6 на група.

Разделът „**Резултати**“ е представен на изключително високо научно ниво. Систематично са изложени резултатите от серия експерименти, включващи морфологични, клетъчни и молекулярни изследвания, проведени върху малкия мозък на мишки от див тип и Zbtb20^{-/-} мутанти, в няколко ключови постнатални възрастови етапа (P4, P8, P12), както и на ембрионален ден E16 и зряла възраст (P30). Всеки раздел включва: въведение към конкретния експеримент, описание на наблюденията, количествен анализ, визуализация чрез микрофотографии, статистическа обработка (*t*-тест, *p*-стойности).

В дисертационния труд на д-р Искрен Великов е систематично проследена експресията и функционалната роля на транскрипционния фактор *Zbtb20* в развитието на малкия мозък при миши модел. Докторантът демонстрира, че нормалната експресия на *Zbtb20* е ограничена до герминативни и глиални зони – външна и вътрешна ромбична устна, външен зърнест слой и слой на Пуркиние – с липса на експресия в постмитотични неврони, включително NeuN+, Calbindin+, Calretinin+ и Tbr2+ клетки. Чрез имунохистохимични и количествени анализи е показано, че *Zbtb20* се експресира в невронални прекурсори и Бергманова глия, което ясно дефинира неговата роля като регулатор на ранната диференциация и глиална поддръжка. Морфологичният анализ при *Zbtb20*^{-/-} мутанти разкрива аномалии във фолиацията на малкия мозък (допълнителни цепки и подфолия в зони III, IV–V, VI, IX, X), при запазен общ обем, което свидетелства за участие на *Zbtb20* в топографската организация на мозъчната кора. Анализът на слоевата морфология (EGL, ML, IGL, слой от клетки на Пуркиние) установява фокални, но статистически значими разлики в дебелината и клетъчния състав, особено на P12 – включително задържане на EGL и променена численост на Calbindin+ клетки, което предполага нарушения в миграцията, диференциацията или преживяемостта. Гранулните неврони (Pax6+) не показват глобална редукция, но при *Zbtb20*^{-/-} се наблюдава регионална дезорганизация. Пролиферативната активност (Ki-67+) също е непроменена глобално, но повишена локално в специфични фолия на по-късен постнатален етап. Интерневронални (Tbr2+) и четковидни (Calretinin+) клетки не са количествено повлияни, което подчертава клетъчната селективност на *Zbtb20*. Установено е участие на *Zbtb20* и в олигодендроцитната линия (Olig2+), без индикации за патологична глиална пролиферация. В обобщение, трудът доказва, че *Zbtb20* играе важна роля като клетъчно специфичен и топографски ограничен регулатор на глиална диференциация, архитектурно моделиране и клетъчна стабилност в развиващия се малък мозък.

Препоръки: 1) многопараметричен анализ: Препоръчвам да се използва ANOVA за групови сравнения, за да се изключат случайни разлики; 2) Корелации между параметри: Липсват анализи, свързващи фолиацията с клетъчните показатели – например: фолия с повишена пролиферация и допълнителни гънки. 3) таблици: смятам, че ще бъде полезно да се обобщят резултатите по тип клетка, възраст и ефект в таблица.

Разделът „**Резултати**“ представя системно и детайлно изследване с многопластов подход, комбиниращ анатомичен, клетъчен и молекулярен анализ. Д-р Великов демонстрира високо ниво на аналитично мислене, способност за интеграция на хистологични и статистически

данни, както и умение за извеждане на оригинални научни заключения. Резултатите показват както нови находки, така и потвърждение на известни хипотези, като подчертават значението на Zbtb20 като регулатор на локални морфогенетични и клетъчни процеси в развиващия се малък мозък.

Разделът „Обсъждане“ представлява завършен и дълбоко аналитичен компонент от дисертационния труд, който успешно интегрира експерименталните резултати в контекста на съвременната невронаучна литература. Докторантът демонстрира висока научна култура, като проследява връзките между експресията на Zbtb20 и регулацията на глиални и прекурсорни невронални популации в развиващия се малък мозък. Чрез системен анализ се аргументира, че Zbtb20 изпълнява своята функция основно в глиалната ниша – включително Бергманова глия, астроцити и олигодендроцити – и по този начин индиректно влияе върху невроналната диференциация, миграция и организация на кортикалната пластичност. Обсъждането на нарушенията във фолиацията и динамиката на клетките на Пуркиние е научно убедително и навременно поставено в контекста на пространствената регулация на церебеларното развитие. Докторантът обективно отчита както наблюдаваните ефекти, така и липсата на такива върху някои клетъчни популации (напр. интерневрони, четковидни клетки), като подчертава специфичността на действието на Zbtb20. Аргументацията е обоснована с референции, но моята препоръка е включване на молекулни механизми или моделни схеми на взаимодействие. Като цяло, разделът е пример за научна зрялост и ясно изградена концептуална рамка.

Разделът „Изводи“ съдържа 14 ясно формулирани и логично структурирани изводи, които отразяват основните резултати от дисертационното изследване. Д-р Великов последователно представя ключовите ефекти на Zbtb20 върху различни клетъчни популации в малкия мозък, подчертавайки неговата селективна експресия в глиални клетки и ролята му в церебеларната фолиация и клетъчна организация. Изводите са обективни и съответстват напълно на получените резултати, като демонстрират пълно покритие на поставените цели и задачи.

Докторантът формулира както оригинални, така и потвърдителни **приноси**. Сред оригиналните се открояват количественият и качествен анализ на невронални и глиални популации в малкия мозък на Zbtb20-/- мишки и предложението за нова концепция за глиално-медирана регулация на мозъчното развитие от страна на Zbtb20. Приносите са значими, добре аргументирани и ясно дефинирани, като удостоверяват оригиналността на научното изследване и неговата стойност за невронауките.

Заклучението представя смислово и концептуално обобщение на дисертационния труд, като го поставя в по-широк биомедицински контекст. Авторът не само подчертава значението на своите открития, но и демонстрира научна зрялост чрез акцентиране на нерешени въпроси и посоки за бъдещи изследвания.

Разделът **„Публикации и научни съобщения“** убедително представя научната ангажираност и активност на докторанта през целия период на изготвяне на дисертационния труд. Включената научна публикация в рецензирано списание със съдържание, тясно свързано с темата на дисертацията, показва способността на автора да формулира и публикува значими научни резултати. Особено силно впечатление прави участието с доклади и постери на шест научни форума, сред които международни конференции и национални конгреси, свързани с анатомия, невронаука и развитие. Тези изяви показват, че докторантът не само работи задълбочено по своята тема, но и активно я представя пред научната общност, демонстрирайки увереност, последователност и умение да защитава резултатите си.

Публикационната активност на докторанта е адекватна към момента на защитата, но притежава сериозен потенциал за разширяване и международно утвърждаване. Препоръчително е резултатите от дисертационното изследване да бъдат развити в поне две-три тематично насочени публикации в международни специализирани списания с по-висок импакт фактор. Така ще се повиши видимостта и цитируемостта на труда, а приносите ще получат по-широко признание в научната общност.

Авторефератът на д-р Искрен Великов представя ясно и изчерпателно основните акценти от дисертационния труд, като синтезира в кратка форма научната обосновка, целите, използваните методи, основните резултати и приноси. Авторефератът е логично структуриран, с добре формулирани раздели, които дават пълна представа за хода и съдържанието на изследването. Научната терминология е коректно използвана, а стилът е стегнат и ясен, без отклонения от научния фокус. Представените резултати са синтезирани така, че да подчертаят най-съществените наблюдения и оригиналните аспекти на работата. Изводите и приносите са съответстващи на реално постигнатото и убедително формулират стойността на изследването.

IV. Заключение

Дисертационният труд на д-р Искрен Великов представлява методологично прецизно, научно обосновано и оригинално изследване върху ролята на транскрипционния фактор Zbtb20 в развитието на малкия мозък. Темата е актуална и с висока значимост за фундаменталната

невронаука, като трудът успешно запълва съществуваща празнина в знанията за функциите на Zbtb20 извън класически изследвани структури като хипокамп и кора. Експерименталният подход е съвременен и съчетава различни хистологични, имунофлуоресцентни и количествени методи, прилагани върху добре охарактеризиран животински модел. Авторът е формулирал ясни цели, които са напълно постигнати, а резултатите са изчерпателно анализирани и обективно обсъдени в контекста на международната научна литература. Постигнатите изводи не само потвърждават съществуващи концепции, но и въвеждат нови гледни точки относно глиалното посредничество в невроналната организация. Научните приноси са ясно дефинирани, а публикационната активност е с потенциал за разширяване.

С увереност заявявам, че Искрен Боянов Великов притежава качествата на изследовател и 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 Искрен Боянов Великов.

Заличено на основание чл. 5,
§1, б. „В“ от Регламент (ЕС)
2016/679

Изготвил становището,
проф. д-р Димитринка Атанасова-Димитрова,
06.06.2025г.
гр. Стара Загора