

РЕЦЕНЗИЯ

от **проф. д-р Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова**
член на научното жури, утвърдено със Заповед № Р-109-182/08.04.2025 г.
на Ректора на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

на дисертационния труд
на **д-р Радослав Христов Спасов**
на тема

**„РОЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР RAH6 В РАЗВИТИЕТО
НА МАЛКИЯ МОЗЪК ПРИ МИШКА“**

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 Антон Божидаров Тончев, д.м.н

Настоящата рецензия е изготвена с оглед публичната защита пред научно жури на представения от докторанта д-р Радослав Христов Спасов, дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“. Представените документи и материали напълно 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

Радослав Христов Спасов е роден на 14 октомври 1988 г. в гр. Кюстендил, България. Завършва медицина през 2014 г. в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, където през 2021 г. придобива и специалност по анатомия, хистология и цитология. От 2015 г. до момента заема длъжността „асистент“ в Катедрата по анатомия и клетъчна биология към същия университет.

От 2018 г. е докторант по анатомия, хистология и цитология. Научните интереси на д-р Спасов са свързани с молекулярните механизми на неврогенезата, особено с ролята на транскрипционни фактори в развитието на малкия мозък при мишки. Активно участва в

научноизследователски проекти, свързани с церебрална исхемия и молекулярна неврогенетика.

Научната продукция на д-р Спасов включва няколко оригинални статии, публикувани в реномирани международни и национални списания, сред които *International Journal of Molecular Sciences*, *Neuropharmacology* и *Varna Medical Forum*. Той е съавтор на над пет научни публикации и е участвал в множество симпозиуми с устни и постерни доклади. Сред последните му изследвания е и настоящият дисертационен труд, посветен на ролята на транскрипционния фактор Рах6 в развитието на малкия мозък при мишка, разработен под ръководството на проф. д-р Антон Тончев, д.м.н.

Към момента Радослав Спасов, дм е член на Българското анатомично дружество, Европейската федерация по експериментална морфология (EFEM), Международната федерация на асоциацията на анатомите (IFAA) и активно участва в разработването на научни проекти, финансирани от Национални и Европейски източници.

II. Общи впечатления и актуалност на темата

Представеният дисертационен труд е научно изследване, посветено на фундаментален проблем в невроразвитието – молекулярните механизми, регулиращи развитието на малкия мозък при бозайници, с фокус върху транскрипционния фактор Рах6. Авторът демонстрира отлична подготовка в областта на анатомията, ембриологията и молекулярната невробиология, като съчетава класически морфологични методи с модерни генетични подходи (като условен нокаут с Cre/lox система). Структурата на труда е стриктно логична и научно обоснована, с ясно дефинирани цели, задачи, методология и последователна интерпретация на резултатите.

Темата на дисертационния труд е изключително **актуална**, тъй като развитието на малкия мозък е пряко свързано както с двигателни, така и с когнитивни функции. Малкият мозък е централна структура в регулацията на фина моторика, равновесие, както и някои аспекти на ученето и емоционалната регулация. Транскрипционният фактор Рах6 е от ключово значение за множество процеси в нервната система, като нарушената му експресия е свързана със сериозни вродени малформации и невропатологии, включително аутистичен спектър, медулобластом и аненцефалия.

Използването на *мишки с условен нокаут на Рах6* предоставя възможност за изолирано изследване на неговата функция след раждането – проблем, който не може да бъде

изследван при общ нокаут поради перинаталната леталност. Това прави изследването особено ценно и навременно, имайки предвид бързо нарастващия интерес към регенеративната невробиология и прилагането на стволови клетки и генна терапия в неврологичната клинична практика.

Впечатляващ аспект на изследването е проследяването на структурните и количествени промени в мозъчната тъкан чрез морфометрия и имунофлуоресцентна микроскопия, което потвърждава ролята на Рахб не само като трансформиращ, но и като поддържащ фактор в диференциацията и миграцията на глутамат-ергичните неврони. Тези резултати имат потенциално приложение в разработката на модели на заболявания, свързани с нарушена неврогенеза.

III. Структура и яснота на изложението

Дисертационният труд на тема „Роля на транскрипционен фактор Рахб в развитието на малкия мозък при мишка“ е написан на 144 страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Съдържание* – 4 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 21 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материал и методи* – 18 стр., *Резултати* – 74 стр., *Обсъждане* – 7 стр., *Изводи* – 1 стр., *Приноси на дисертационния труд* – 1 стр., *Библиография* – 9 стр., включваща 124 литературни източника, всички на латиница. *Публикации и доклади във връзка с дисертационния труд* – 1 стр., *Използвани съкращения* – 3 стр., *Благодарности* – 1 стр. Трудът е онагледен с 71 фигури (повечето, от които са комбинирани фотомикрографии), 33 диаграми и 3 таблици.

Уводът на дисертационния труд е структуриран ясно и логично, като обхваща съществени аспекти на темата: значимостта на малкия мозък, ролята на невроналните популации, и мястото на транскрипционния фактор Рахб в ембрионалното и постнаталното развитие.

Докторанта ясно дефинира основния научен проблем – недостигът на знания за постнаталната роля на Рахб в церебеларната неврогенеза поради леталността при тотален нокаут. Оттук логично се аргументира нуждата от изследване чрез условен нокаут модел. Това поставя основата на научната хипотеза и експерименталната рамка на дисертационния труд.

Литературният обзор е подреден последователно – започва с обща информация за ембрионалното развитие при бозайници, после се преминава към развитието на малкия

мозък и завършва с молекулярните маркери и конкретната роля на Pax6. Такава структура улеснява ориентацията на читателя. Обзорът демонстрира добро познаване на ембрионалната неврология, с включване на релевантни гени като *Atoh1*, *Lmx1a*, *Tbr1*, *Tbr2*, *NeuroD1/2* и *Pax6*. Особено ценно е проследяването на пространствено-времевата експресия на тези маркери в различни слоеве на малкия мозък. Използвани са съвременни и авторитетни източници – включително статии от последните 5–10 години, както и класически трудове, свързани с развитието на мозъка. Това показва добро критично мислене при подбора на литература.

Обзорът ефективно подготвя читателя за поставените научни въпроси в дисертацията – ясно се демонстрира защо е необходимо да се използва *условен нокаут* на Pax6 (а не глобален) и каква е логиката за избор на определени времеви точки (E12.5–E17.5, P7–P21). Обяснението за ролята на Rhombic lip, външен и вътрешен зърнест слой, както и транскрипционни каскади ($Ptf1a \rightarrow Pax2 \rightarrow Gsx1 \rightarrow NeuroD2$) пряко обясняват избора на използвани маркери в експерименталната част (BrdU, Tbr1, NeuroD2 и др.). Литературният обзор притежава висока научна стойност за изграждането на методологичната рамка на дисертацията.

Фокусирана и конкретна цел: Главната цел – да се анализират морфологичните промени в малкия мозък при редуцирана експресия на Pax6 – е ясно формулирана, научно обоснована и в пълно съответствие с темата на дисертацията. Формулировката на задачите е добре структурирана, логически последователна и съответства на научната цел. Описани са четири ясно разграничими **задачи**, които следват логично: 1) генериране на подходящи контролни и мутантни проби; 2) хистологична обработка на мозъчни тъкани на няколко времеви точки (пренатални, постнатални и адултни); 3) приложение на клетъчни и молекулни маркери; 4) количествени морфометрични и клетъчни анализи.

Разделът „**Материал и методи**“ е добре структуриран и детайлно описан. *Изчерпателност:* Методологичната част е изключително подробна и обхваща целия експериментален процес – от избор на животински модел до анализ на изображенията. Това показва отлична експериментална култура и прецизност. *Избор на трансгенна линия:* Употребата на условен нокаут чрез $Tel-Cre::Pax6^{fl/fl}$ за избягване на перинатална леталност е научно адекватен подход, който демонстрира разбиране на ограниченията на модела. *Техническа прецизност:* Описани са подробно техники като имунохистохимия,

имунофлуоресценция, светлинна и флуоресцентна микроскопия, включително настройки на микроскопа, експозиции, използвани формати на изображения и програми за анализ (напр. Fiji ImageJ). *Изброяване на използваните антители*: Включването на таблици с първични и вторични антители, включително производител и концентрация, е пример за добри практики във воденето на документацията.

Разделът „**Резултати**“ е ясно структуриран, като следва логическа и експериментална последователност. Основните подраздели включват: 1) Нормална експресия на Pax6 в развиващия се малък мозък като се установява базовият модел на експресия; 2) Данни от репортерна миша линия Tel-Cre::Rosa26 с цел потвърждаване на пространствено-времевата активност на Cre-системата; 3) Изследвания върху мутантна линия Tel-Cre::Pax6^{fl/fl}, което е централната част от анализа, с богата количествена обработка. Този раздел е допълнително разгърнат в няколко подчасти, обхващащи: количествени анализи на площ, дебелина и дължина на слоевете (зърнест, молекулярен, Пуркиние), оценка на клетъчната плътност, статистическа значимост на отклоненията в мутирания фенотип. Използван е високоспецифичен подход: имунофлуоресценция, микроскопия (Axio Imager Z2), анализ с Fiji ImageJ (за площ, дебелина, дължина, брой клетки), валидиране с NeuN, Calbindin, Parvalbumin и други маркери.

Резултати от репортерната линия (Tel-Cre::Rosa26): Доказва се експресия на Cre-рекомбиназата в целевите клетъчни популации (Pax6-позитивни), включително в зърнестите клетки. Това валидира приложимостта на модела за изследване на транскрипционния фактор Pax6 в по-късни етапи от развитието (E12.5–P21).

Основни находки от мутантния модел (Tel-Cre::Pax6^{fl/fl}): Малкият мозък на мутантите показва значително редуцирана площ на кората (до 48% спад) и зърнестия слой (до 32% спад). Разликите в дебелината са по-слабо изразени (11% спад), като при някои нива не достигат статистическа значимост. Това поражда интересния извод, че площта зависи по-силно от дължината, отколкото от дебелината на слоевете. Измерванията показват съществено съкращаване на дължината на молекулярния слой (над 40% спад) при запазена дебелина – това е ключов приносен елемент от анализа. Намаленият брой клетки на Пуркиние и зърнести клетки е статистически значим. Това предполага нарушена не само морфогенеза, но и неврогенеза.

Раздел „Резултати“ демонстрира висока *детайлност и техническа компетентност* при количествените анализи. *Силна логическа връзка* между цел, методика и резултати. Нов модел за анализ на условна експресия на Рахб, с потенциал за бъдещи проучвания върху клетъчна съдба. Прозрение, че *морфометричните изменения се дължат не само на клетъчна загуба, но и на геометрични промени* (намалена дължина на слоевете).

Разделът „Резултати“ в дисертацията на д-р Радослав Спасов е пример за **добре организирано, задълбочено и научно аргументирано изследване**, което отговаря на критериите за дисертационен труд в областта на анатомията и невробиологията.

Разделът „Дискусия“ представлява кулминационна част от дисертационния труд, в който докторантът интегрира основните експериментални резултати в контекста на съвременното знание за развитието на малкия мозък при мишка и ролята на транскрипционния фактор Рахб. В този смисъл, анализът е адекватно структуриран, съдържателно обоснован и до голяма степен отговаря на изискванията за критична научна интерпретация. Дискусията следва логиката на представените резултати – всеки обсъден аспект има пряка емпирична основа. Особено добре е проследена връзката между морфометричните анализи и промяната в повърхността/площа на малкия мозък; имуномаркерите и състоянието на гранулозните клетки; нарушенията в клъстерирането на Пуркиние клетките и Рахб-зависимите сигнали.

Докторантът обосновано идентифицира Рахб като ключов регулатор на нормалното формиране на кортикалната структура на малкия мозък. Представените наблюдения върху модела (Tel-Cre::Рахб^{fl/fl}) са обвързани със специфични фенотипни прояви като: 1) деформация и редукция на церебеларната фолиация; 2) аберации в разположението на гранулозни и Пуркиние клетки; 3) нарушено ламинарно подреждане. Тези находки са сравнени със съществуващи данни от *in vitro* и ембрионални модели, което придава дълбочина на анализа и демонстрира задълбочено познаване на областта.

Д-р Радослав Спасов убедително защитава тезата, че настоящото изследване е **първото**, което демонстрира постнатален церебеларен фенотип при условно редуцирана експресия на Рахб *in vivo*. Това е оригинален научен принос, който разширява разбирането за постнаталните функции на Рахб извън неговата ембрионална роля.

Изследването разширява познанието за ролята на Рахб след раждането, като показва, че той е необходим не само за ембрионалното формиране на мозъка, но и за: правилната

постнатална организация на слоевете на малкия мозък; пролиферацията, миграцията и позиционирането на неврони. За първи път е създаден жизнеспособен модел, при който специфично се редуцира експресията на Pax6 в малкия мозък преди раждането, но без да се нарушава преживяемостта на животните. Това отстранява ограниченията на глобалните нокаут модели, при които настъпва перинатална смърт. Документирани са конкретни морфологични и клетъчни аномалии – намалена площ, изтъняване на гранулозния слой, ектопични клетки и загуба на специфични невронни популации, като всичко това се наблюдава в различни възрастови етапи. Това подчертава ролята на Pax6 в динамиката на невроразвитието.

Моделът и методиката, използвани в дисертацията, предоставят нов инструментариум за бъдещи изследвания върху: молекулни механизми на невродегенерация; мозъчна пластичност и възстановяване; изследвания на човешки заболявания, асоциирани с PAX6 (напр. аниридия, атипични форми на аутизъм и церебеларни хипоплазии). Обединението на количествени (морфометрия, статистика) и качествени (хистология, имунофлуоресценция) методи води до надеждни изводи и повишава научната стойност на данните.

Изводите и приносите свидетелстват, че дисертационният труд: успешно запълва празнина в познанието относно постнаталната функция на Pax6; предлага нов модел и нови данни със силна приложимост в невронауките; допринася не само за фундаменталната биология, но и за потенциални биомедицински приложения.

Докторантът демонстрира реална научна активност чрез участие в международен форум и публикации в научни списания. Въпреки че основните резултати са публикувани в национално издание, се препоръчва публикуването на поне една водеща статия в международно рецензирано списание, за да се повиши видимостта на приноса.

Авторефератът на д-р Радослав Христов Спасов е структурно завършен, научно адекватен и убедително представя основните резултати, методи и принос на дисертационния труд. Представянето на оригиналния модел и неговите резултати е ясно аргументирано. Езиковата култура и стилистична последователност допринасят за висока научна достоверност.

IV. Заключение

Представеният дисертационен труд на д-р Радослав Христов Спасов е резултат от задълбочена експериментална работа, научна ангажираност и оригинален изследователски

подход. Чрез разработването на жизнеспособен модел с условна загуба на функцията на Рахб, докторантът успешно преодолява едно дългогодишно ограничение в развитието на невроанатомичните изследвания – а именно невъзможността да се изучават постнатални ефекти при глобален нокаут на този ключов транскрипционен фактор. Резултатите, представени в дисертацията, не само допълват съществуващото знание, но го разширяват с конкретни морфологични, количествени и клетъчни данни за развитието на малкия мозък. Особено внимание заслужава установяването на взаимозависимостта между глутаматергични и ГАМК-ергични неврони, както и възможната роля на Рахб в поддържане на невроналната архитектура и миграционните процеси. Съдържанието на дисертацията е научно издържано, ясно изложено и отразява висока експериментална култура. Оформлението, езиковото качество и публикуваните резултати допълнително свидетелстват за зрялост и професионализъм в научната работа.

С увереност заявявам, че д-р Спасов притежава качествата на самостоятелен 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 д-р Радослав Христов Спасов.

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

Изготвил рс

проф. д-р Димитринка Атанасова-Димитрова,
10.05.2025г.
гр. Стара Загора