

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: Д-Р РАДОСЛАВ ХРИСТОВ СПАСОВ

ТЕМА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: „*РОЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР RAХ6 В
РАЗВИТИЕТО НА МАЛКИЯ МОЗЪК ПРИ МИШКА*”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р АНТОН БОЖИДАРОВ ТОНЧЕВ, Д.М.Н.

Радослав Христов Спасов е редовен 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 Радослав Спасов е зачислен (със заповед № Р-109-72/15.01.2018 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-109-178/01.03.2023 г. на Ректора на МУ-Варна той е отчислен, съгласно решение на Факултетния съвет на факултет „Медицина” по протокол № 82/20.02.2023 г., с право на защита пред научно жури.

Дисертационният труд на тема „*Роля на транскрипционен фактор RAх6 в развитието на малкия мозък при мишка*” е написан на 144 стандартни страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Титулна страница*, *Съдържание* – 4 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* – 21 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материал и методи* – 18 стр., *Резултати* – 74 стр., *Дискусия* – 7 стр., *Заключение* – 1 стр., *Изводи* – 1 стр., *Приноси* – 1 стр., *Библиография* – 9 стр., включваща 124 заглавия, всичките на латиница, *Публикации и доклади във връзка с дисертационния труд* – 1 стр., *Списък на използваните съкращения* – 3 стр., *Благодарности* – 1 стр. Собствените резултати са онагледени с 55 фигури, които представляват табла с поредица от монтирани микрофотографии и диаграми. Освен това, в литературния обзор са включени още 8 комбинирани схематични изображения (с посочен оригинален източник), които подкрепят историографските данни, в раздела *Материал и методи* се съдържат 7 фигури, включващи схеми, екранни снимки (screenshots) и топлинни карти, както и 2 таблици,

нагледно изброяващи използваните в имунофлуоресцентните оцветявания антитела, а обсъждането е илюстрирано с една сравнителна фигура и една таблица с морфометрични данни за установените фенотипни промени в развиващия се малък мозък у мишка. Така действителният брой на цялостната онагледяваща фотодокументация се оказва значително по-голям от посочения в раздела *Резултати*.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на един социалнозначим и изключително актуален проблем на фундаменталната невробиология и транслационната медицина – ембрионална и адултна неврогенеза. Въпреки че в последните две десетилетия клетъчните и молекулярните механизми, които регулират процеса на развитие на малкия мозък при гризачи, са предмет на интензивни изследвания, все още се знае относително малко за ролята на транскрипционен фактор Рахб в ембрионалната малкомозъчна неврогенеза, както и потенциалното му участие в постнаталната диференциация и миграция на новогенерираните корови малкомозъчни неврони. В този смисъл докторантът си е поставил амбициозната задача да установи морфологичните промени в клетъчните популации в развиващия се малък мозък в условия на селективен Рахб нокаут. С оглед на известната понастоящем зависимост между отклоненията в правилното формиране на малкия мозък, дължащи се в частност и на заглушена експресия на Рахб, и етиопатогенезата на някои нарушения в невропсихичното развитие с голяма социална значимост като напр. разстройства от аутистичния спектър, изясняването на потенциалното функционално значение на този транскрипционен фактор за церебеларната неврогенеза и постнаталното диференциране на невроналните популации в малкия мозък 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 малкия мозък при бозайници и за молекулярния контрол на ембрионалната неврогенеза в него, описани са в хронологичен ред по време на ембрионалното развитие първоначалните селективни маркери на прогенитори в двете герминативни ниши на малкомозъчния зачатък – вентрикулна зона и ромбична устна, както и последващите такива за зреещи клетки в развиващата се малкомозъчна кора и дълбоки

малкомозъчни ядра. Представена е в детайли ролята и ефекта от намалената експресия на транскрипционен фактор Pax6 за генериране на прекурсори на прогениторни клетки в ранното ембрионално развитие и потенциалните последици от липсата му за тяхната постнатална диференциация и миграция. Приведени са убедителни аргументи за създаване на подходящ експериментален миши модел за изследване на този феномен постнатално. Литературните данни са подходящо илюстрирани с фигури и схематични рисунки от текущата периодика. От цитираните литературни източници близо половината са публикувани през последните две десетилетия, вкл. 1 статия от 2024 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.

Целта е ясно и точно дефинирана. **Задачите** са правилно поставени и, както ще се разбере от последващото изложение, са реално изпълними с помощта на използваните методи.

Разделът „**Материал и методи**“ е детайлен и достатъчно изчерпателен. За целите на проучването е генерирана чрез дихидбридно кръстосване на две генетични линии трансгенна миша линия, която е отгледана и генотипизирана в съответствие с етичните изисквания на провинция Долна Саксония, Германия, откъдето 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 имунофлуоресцентните оцветявания, анализът на дигитализираните микроснимки и проведения статистически анализ за оценка на получените морфометрични данните са надлежно онагледени и изложени с акуратност и стъпка-по-стъпка изчерпателност, позволяваща тяхната повтораемост от други изследователи. Необходимата информация за използваните в изследванията първични и вторични антители, 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 една имунохистохимична реакция.

Разделът „**Резултати**“ е изложен в над половината от общия обем на дисертацията. Той е разделен описателно на подраздели, следващи хронологично поставените конкретни задачи. В началото на раздела подробно са изложени общоизвестните експресионни модели на Рахб в развиващия се и оформен малък мозък, които служат за основа за сравнителна оценка на количествените промени в него при заглушена експресия на този транскрипционен фактор. За целта е сравнена експресията на Рахб в герминативните зони на малкомозъчния зачатък в различни времеви интервали с тази на ген-репортери от публичните база данни. С помощта на широк панел от клетъчни и молекулярни маркери за невrogenеза и глиогенеза, разграничаващи отделните субпопулации церебеларни неврони, последователно са обрисувани моделите на разпределение, гъстотата и фенотипа на Рахб-позитивните невронални стволови клетки в развиващия се миши малък мозък, описан е феномена на редукция в площта и фолиациите на малкомозъчната кора при мишите мутанти, установено е дължащото се на заглушената експресия на Рахб снижение на броя на невроналните субпопулации (зърнести и еднополярни четковидни клетки, клетки на Пуркиние и Голджи) в малкомозъчната кората на постнатален и адултен етап на развитието ѝ, описани са ефектите на този транскрипционен фактор върху постнаталното развитие и миграцията на кортикалните малкомозъчни неврони. Приведени са конкретни количествени данни за селективна постнатална дисгенезия в малкия мозък на мишки с глобален нокаут на Рахб гена, характеризираща се с намалена корова площ, изтънен зърнест слой, дисперсия на неврони в бялото вещество на малкомозъчната кора и наличие на ектопични клъстери в него при мутантите. В същото време, чрез статистически анализ с подходящ софтуер Спасов е документирал сигнификантност на получените морфометрични данни.

Изключително високо оценявам факта, че всички авторски находки са подкрепени от достатъчен илюстративен материал под формата на представителни фотомикрографии и имунофлуоресцентни микроскопски изображения с много високо качество, а статистическите данни, представени като графики, инкорпорирани в общия панел, дават богата и прегледна информация за установените количествени показатели в броя и процентното съотношение на имунопозитивните клетки в изследваната зона и възрастов период.

Дискусията е не особено пространна, но 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 морфологията на малкия мозък в постнаталния период при миши модел с глобален нокаут на Рахб гена. На преден план в нея са изведени достойнствата на новосъздадения подходящ мутант, който е позволил нагледно да бъде демонстриран постнаталния церебеларен фенотип в условията на селективен Рахб нокаут. Обсъдени са възможните причини за неправилното нагъване на малкомозъчната кора при намалена функция на този транскрипционен фактор, включващи дисрегулация на важни сигнални пътища. Съпоставяйки собствените данни за снижени миграционен и пролиферативен индекс на клетките при мишите мутанти с тези, получени върху клетъчни култури, е направен ценен извод за степента на тяхната постнатална диференциация след Рахб нокаут. Определен практически интерес има също така дискусията за конкретната връзка между занижените Рахб нива и клетъчната смърт във външния зърнест слой, допринасяща за изясняване на механизмите на отклонения от нормалното им съзряване в малкомозъчната кора. Силно впечатление прави също така изказаното предположение за реално участие на Рахб в механизма на миграция на клетките на Пуркиние в постнаталния период.

Задълбоченото обсъждане и анализ на получените данни са послужили на докторанта за добра основа за прецизно формулиране на **изводите** от настоящото проучване. Те са конкретни, лаконични и точно отразяват авторските заключения, произтичащи от натрупаните нови данни. Като цяло приемам 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 Рахб върху развитието на малкия мозък.
2. За пръв път се демонстрира експериментален модел на миши мутант със селективно заглушена експресия на Рахб в малкия мозък.
3. Приведени са оригинални морфометрични данни за ефекта на Рахб върху церебеларната морфология в постнаталния и адултен стадий на развитие.
4. Новаторски характер имат установените количествени промени в морфологията и клетъчния състав на малкия мозък след завършване на церебеларната неврогенеза в условията на глобален Рахб нокаут.

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 Радослав Спасов. Резултатите от експериментите са отразени в 3 публикации в реферирани научни списания, една от които е публикувана в списание с импакт фактор, попадащо в Q1 категория, но в нито една от тези статии Стоянов не е първи автор. Това се отнася и до единственото научно съобщение по темата на дисертацията, представено на международен научен форум. В тази връзка и с оглед на актуалността на разглеждания научен проблем и оригиналността на получените резултати, бих си позволил настоятелно да препоръчам на докторанта и неговия научен ръководител да направят необходимото за популяризиране на тези авторски находки в международната научна периодика.

Дисертацията е написана ясно, на разбираем научен език и стил на изложението, но в текста се забелязват редица правописни и/или стилистични грешки. Използвани са сравнително неголям брой специфични термини и съкращения, което я прави лесно читаема и разбираема и за неспециалистите в тази област. **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.

В **заключение** считам, че дисертационният труд на д-р Радослав Спасов е едно комплексно и задълбочено проучване върху изключително 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 церебеларната неврогенеза и нейните регулаторни механизми. Независимо от някои посочени по-горе недостатъци на труда, резултатите от изследването внасят оригинален и значим теоретично-приложен принос за изясняване на факторите и механизмите на постаталното развитие на малкия мозък и, по-конкретно, на влиянието на Рахб гена върху малкомозъчната морфология след завършване на церебеларната неврогенеза. Без съмнение, съществен принос за успешната реализация на този проект 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 Радослав Христов Спасов.

12.05.2025 год.
гр. София

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

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