

## **РЕЦЕНЗИЯ**

от проф. д-р Стефан Тодоров Сивков, дм  
Катедра по анатомия, хистология и ембриология  
Медицински университет-Пловдив

**Относно:** дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор” в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, научна специалност Анатомия, хистология и цитология

**Автор:** Д-р Димо Стоянов Стоянов

**Тема:** „РОЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР ZBTB20 В РАЗВИТИЕТО НА ИНТЕРНЕВРОНИ В КРАЙНОМОЗЪЧНА КОРА НА МИШКА”

**Научен ръководител:** проф. д-р Антон Божидаров Тончев, дмн (Катедра по анатомия и клетъчна биология, Медицински университет-Варна)

1. **Общо представяне на процедурата и докторанта.** Със заповед № Р-109-481/14.12.2022 г. на Ректора на Медицински университет - Варна, съм определен за член на Научното жури във връзка с процедурата за защита на дисертационния труд на тема „Роля на транскрипционен фактор Zbtb20 в развитието на интерневрони в крайномозъчна кора на мишка” за придобиване на ОНС „Доктор” в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, научна специалност Анатомия, хистология и цитология. Автор на дисертационния труд е д-р Димо Стоянов Стоянов – докторант в самостоятелна форма на обучение към Катедра „Анатомия и медицинска биология” на Медицински университет-Варна с научен ръководител проф. д-р Антон Тончев, дмн (Катедра по анатомия и клетъчна биология, Медицински университет-Варна). За изготвяне на рецензията получих материалите, изискващи се от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени заемане на академични длъжности в Медицински университет-Варна .

Представеният от автора Димо Стоянов Стоянов комплект включва следните документи:

1. Молба по образец до ректора за откриване на процедура;
2. Автобиография по европейски формат;
3. Протокол от предварителното обсъждане в катедрата;
4. Автореферат;
5. Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
6. Справка за спазване на минималните национални изисквания;
7. Списък на публикациите;
8. Дисертационен труд;
9. Копия на публикациите по темата на дисертационния труд;

Представените документи покриват изискванията на Закона за Развитие на академичния състав в РБ и Правилника за прилагането му и Правилника на МУ-Варна за допускане до защита на ОНС „Доктор”.

Докторантът Димо Стоянов е роден през 1990 г. в гр. Варна. Средно образование получава в IV Езикова гимназия през 2009 г., Варна. През 2015 г. завършва висше образование в Медицински университет-Варна, Факултет по медицина с придобита ОКС „Магистър“ и професионална квалификация „Магистър лекар“. През 2016 г. е назначен като асистент на хонорар в катедрата по „Анатомия и клетъчна биология“ към Медицински Университет "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна, като около година по-късно е зачислен редовен асистент. През 2021 успешно полага изпит за присъждане на специалност „Анатомия, хистология и цитология“.

Със заповед № Р-109-17 от 15.01.2018 г. е зачислен като докторант към Катедра „Анатомия и клетъчна биология“, Медицински университет-Варна. Отчислен е от докторантура с право на защита със заповед Р-109-481/14.12.2022 г. след успешно преминалата вътрешна защита.

От 17.06. до 14.09.2022 г. осъществява мобилност в Катедра по анатомия и молекулярна невронаука Рурски университет на Бохум, гр. Бохум, Германия. Заема длъжността експерт образователни дейности - МУ-Варна, по проект „Създаване на мултидисциплинарна образователна среда за развитие на кадри с интегрални компетентности в областта на биомедицината и здравеопазването“.

**2. Актуалност на тематиката.** Неврогенезата представлява интерес за проучване във връзка с морфологичните изменения, които настъпват в резултат на активно модифициране на състава му. В основата на измененията стои способността невроналните стволови клетки да се делят неограничен брой пъти, запазвайки клетъчния си пул и едновременно с това генерират дъщерни клетки, които могат да се диференцират в множество клетъчни видове. Дисертацията е посветена на произхода на кортикалните интерневрони в кората плъх, молекулярния контрол на формирането на субпалиума и ефекта на ДНК-свързващия протеин *Zbtb20* в регулацията на нормалното развитие и в патогенезата на неопластичните процеси.

**3. Познаване на проблема.** Уводът, както и творческото използване на цитирания литературен материал показват познаване на състоянието на проблема, третиран в дисертацията от докторанта. Докторантът представя достатъчно ерудирано процесите на пренатално развитие на субпалиума, с ролята и съдбата на невронални стволови клетки в неврогенезата. Представена е класификация и е обсъден произхода на кортикалните интерневрони във възрастни животни. Отчетени са пространствените и времеви различия в генерирането на кортикалните интерневрони. Обсъден е молекулярния контрол на формирането на субпалиума.

**4. Характеристика** и оценка на дисертационния труд и приносите. Дисертационният труд е структуриран според общоприетите изисквания - въведение, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи, литературни източници. Представен е върху 119 стандартни страници (103 страници по същество, и една заглавна, 2 съдържание и 13 литературни източници), съдържа 44 фигури и 3 таблици. Използваната литература включва 160 източника на латиница.

58/  
edi  
l(h  
dit

ne

tal

lly

lly

ten

—

—

—

**В Литературния обзор** са разгледани особеностите и отбелязани етапите в ембрионално развитие на субпалиума при мишка. Отделено е внимание на морфологията на невроналните стволони клетки (апикални и базални прогенитори), като е отбелязано разположението, морфологията и отношението между различните прогенитори. Обсъден е начина на делене на стволоните клетки, който позволява да се запази прогениторния пул и води до постепенното нарастване на броя генерирани постмитотични диференцирани клетки. Специално внимание е отделено на особеностите в миграция на кортикалните интерневрони. Представена е класификацията и произхода на кортикалните интерневрони в зрелия кортекс, като успоредно са посочени пространствените и времеви различия в генерирането на кортикалните интерневрони. Дискутирана е връзката между експресия и наблюдаван фенотип при дефекти в *Zbtb2* и определени психични заболявания при хора, както и с някои синдроми проявяващи се фототипно с умствено изоставане и ускорен растеж. Данните обсъдени в литературния обзор позволяват на докторанта да изведе целта на научното изследване и очертае задачите за нейното изпълнение.

**Целта** на настоящото изследване е да се установи ролята на *Zbtb20* като транскрипционен фактор нормалното развитие на коровите интерневрони на мишка.

**Материалът** на изследването е достатъчен по обем, правилно подбран и структуриран, добре документиран и прецизно регистриран, което гарантира достоверност на резултатите. Влиянието на *Zbtb20* върху нормалното развитие на кортикалните интерневрони беше изследвано чрез експериментален модел на глобална „knock-out“ мишка, основан на нарушаване синтезата на цинковите пръсти медиращи свързването на протеина с DNK. Всички опитни животни бяха третирани според „German Animal Protection Law“, след получаване на одобрение от етичната комисия.

**Методика на изследването.** Методологията се отличава с детайлно и компетентно представяне на процеса на проучването. Докторантът е използвал надеждни и достатъчни за постигане на поставената цел методи изследване, с които получава адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд. Добитите и изготвени препарати са изследванията се извършени с методите на имунофлуоресценция, ин-ситу хибридизация. Микрографиите са извършени с Zeiss Axio Imager.Z2 микроскоп и Axiovision софтуер. За изброяване е използван FIJI като микрографиите са експортирани в .tiff файл и нормализирани.

Статистическите методи са подходящо подбрани с информативност необходима за изследването. Извършена е статистическа обработка на данните с R, като са приложени дескриптивна статистика, параметричен (Student's t-test, CI 95%,  $p < 0,05$ ), непараметричен (Chi-square test, CI 95%,  $p < 0,05$ ) и графичен анализ.

Главата „**Резултати**“ заема 31 страници. Получените данни са нагледно демонстрирани и анализирани в представената документация (фигури, графики и таблици). Резултатите са представени много информативно, като дават възможност за представяне на ролята, значимостта и взаимовръзките между изследваните показатели. Снимковият материал е

представен в модерен дизайн и достатъчно илюстративен, като ясно визуализира тезите на дисертационния труд.

Zbtb20 показва повсеместна експресия на mRNA във вентралния теленцефалон, като се наблюдава градиент в силата ѝ. Силна експресия е наблюдавана във вентралните частни на латералната ганглионарна еминенция, браздата между латерална и медиална ганглионарна еминенции, дорзалната част на медиална ганглионарна еминенция и цялата каудална ганглионарна еминенция. Във всички области вентрикуларната зона показва по-високи нива на експресия от субвентрикуларната зона. Чрез експресията на транскрипционен фактор (Lhx6) е установена значима редукция в броя на коровите интерневрони, произлезли от медиалната ганглионарна бразда. С помощта на друг молекулярен маркер (Prox1) е установено намаление в броя на коровите интерневрони, произлизащи от каудалната ганглионарна бразда.

Zbtb20 се експресира във всички части на субпалиума в периода E12.5 - E18.5 при мишка, като липсва нарушение в нормалната регулация при образуването на субпалиума.

При мутантните *Zbtb20*<sup>-/-</sup> мишки авторът установява нарушена времева динамика при генериране на корови интерневрони за различните слоеве и занижение в нивата на пролиферация на стволовите клетки на в периода E12.5 => E13.5 на територията на медиалната ганглионарна еминенция при мишка.

Изследването на експресията на ZBTB20 в човешкия субпалиум през 14-та гестационна седмица установява сходство с тази при мишка, с много по-силна експресия във вентрикуларната, отколкото в субвентрикуларната зона.

**Обсъждането** се характеризира с пълнота и задълбоченост в разсъжденията върху резултатите от изследването в контекста на целта на проучването и литературните данни. Оформените изводи са логични и отговарят на поставените задачи и проведените проучвания.

Авторът има своя **принос** в създаването на оригинална опитна постановка и методика, чрез която е получено успешно визуализиране на игления тракт в езика на плъх. За първи път е околличествена експресията на Zbtb20 в субпалиума на мишка. Анализирани са ефектите на заглушаването на експресията на Zbtb20 върху постнаталния фенотип на CINs в неокортекса на *Zbtb20*<sup>-/-</sup> мишка. Установена е занижена пролиферация в MGE на E12.5 при *Zbtb20*<sup>-/-</sup> мишка. Стволовите клетки в *Zbtb20*<sup>-/-</sup> показват нормална скорост на диференциация. Установен е дефект в нормалното време за генериране на CINs за слоеве 1-4 и слоеве 5-6 при *Zbtb20*<sup>-/-</sup>. За пръв път беше показана експресията на Zbtb20 в субпалиума на човек..

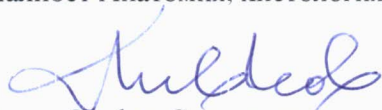
**Преценка на публикациите** и личния принос на докторантката. Основните резултати от дисертацията са публикувани *Biomedical Reviews.*, 2020, *Genes*, 2022, *The International Symposium on Bioinformatics and Biomedicine*. Springer, Cham, 2020. Има и шест съобщения на научни форуми(3 в чубина). Публикациите са в съавторство, като в почти всички докторантът е водещ автор, което ми дава основание да смятам, че има основен принос в резултатите.

**Авторефератът** е структуриран правилно, като отразява съдържанието, основните резултати и приносите на дисертационния труд.

**Препоръките** ми за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати са за прилагането им в по-нататъшното изучаване и разширяване на тази перспективна проблематика, при което получените резултати да се публикуват и в самостоятелни научни статии.

**Заключение.** Дисертационният труд на д-р Димо Стоянов разглежда проблем, който е с научен и практически интерес в областта на неврогенезата. Приложена е оригинална опитната постановка и методика за визуализиране за ролята на *Zbtb20* в нормалното развитие на коровите интерневрони. За целта са използвани хомозиготни мутанти *Zbtb20*<sup>-/-</sup>, при които е заглушена генната експресия. Получени са научни резултати, обогатяващи познанията върху развитието на коровите интерневрони в различните слоеве, пролиферацията на стволовите клетки и миграционните пътища. Това е реален научен принос. Изложението и оформлението на дисертационния труд и на автореферата е много добро. Извършена е голяма по обем и трудна за изпълнение работа. Това показва, че докторантът притежава теоретични знания и професионални умения по научната специалност, както и умения за самостоятелни научни изследвания. Представените материали и документи по процедурата отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на този закон, Регламента за придобиване на ОНС „Доктор” в Медицински университет-Варна.

Въз основа на изложеното давам положителна оценка за проведеното научно изследване в дисертационния труд, като предлагам на почитаемото научно жури **да присъди** на д-р Димо Стоянов образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност Анатомия, хистология и цитология.



Проф. д-р Стефан Сивков, дм

04.01.2023 г.