

СТАНОВИЩЕ

от

д-р Валентин Иванов Турийски – професор, Медицински университет – Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**

професионално направление: **4.3 Биологически науки**

докторска програма: **Клетъчна биология**

Автор: Десислава Иванова Колчакова

Тема: Функционален анализ на протеина клаудин при туморни клетъчни линии

Научни ръководители:

проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов - Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова - Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № Р33-2154 от 11.06.2021 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Функционален анализ на протеина клаудин при туморни клетъчни линии“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование *4. Природни науки, математика и информатика*, професионално направление *4.3 Биологически науки*, докторска програма *Клетъчна биология*. Автор на дисертационния труд е Десислава Иванова Колчакова – докторантка в редовна форма на обучение към катедра “Биология на развитието” с научни ръководители: проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов от Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова от Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Десислава Иванова Колчакова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- протокол от катедрения съвет, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет (само за докторантите зачислени до 04.05.2018 г.);

- докторантът е приложил два броя публикации в реферирани международни издания /вкл. с импакт фактор/, и участие в научен конгрес по темата.

Кратки биографични данни за докторанта

Авторът на дисертационния труд - Десислава Иванова Колчакова е редовен докторант към катедра „Биология на развитието” на Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски” за периода 01.03.2017 - 01.03.2020 г.

Закономерна предпоставка за успешното завършване на тази образователна степен е дипломирането ѝ в бакалавърска програма по биология към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, с проявени в хода на обучението интереси към клетъчна биология, ембриология, микробиология, вирусология и имунология.

Следващо звено в образователния ценз на докторанта е успешната защита на магистърска степен по Репродуктивна биология – в редовна форма на обучение към Биологически факултет, Катедра „Биология на развитието“ на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, с акцент в експертизата на пренаталното развитие при човека (специална ембриология) и принципите на асистираната репродукция.

Ценни стъпки в професионалното израстване и квалификация на Десислава Колчакова са реализацията ѝ по специалността, като член на екипа на Медицински център „Афродита“, специализиран в работата със стволови клетки, както и в екипа на Тъканна Банка СелсФорГуд.

Дисертантът добива опит в преподавателската дейност, като асистент по клетъчна биология в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, към катедра „Биология на развитието“ през периода 01.10.2019 г.- 01.02.2020 г.

Актуалност на тематиката

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем е несъмнен в контекста на медицинската, фундаментална и социална значимост на проучванията върху механизми на туморогенезата, специфичните пътища на метастазиране, и в основна степен - лежащите в основата на това процеси на миграция на клетките и комплексирания характер на междуклетъчни взаимодействия в еволюцията на тези събития на тъканно, органно и организмово ниво. В този смисъл, представеният дисертационен труд отразява обективно и коректно съвременния подход в търсенията по темата и следва да се класифицира като качествен фундаментален проект в областта.

Познаване на проблема

Индикация за наличието на качествен експертен поглед върху разработваната тема е начинът по който литературното проучване, отразено в „Обзор” се експонира и „експлоатира” за целите на евристичния елемент в докторската теза. Добро впечатление остава прочитът на систематизираното знание от световния опит по темата, направен от дисертанта в представения материал.

Редуващите се акценти в анализа на известните до момента данни: върху контактни междуклетъчни взаимодействия на ниво мембрани и детерминиращите ги структурни единици, в това число фокусът на работата – клаудин-12; бариерните функции, обусловени от горните взаимодействия, както и молекулярните аспекти на експресията на специфични интегрални протеини, значими за динамиката на междуклетъчната комуникация, демонстрират изградена у дисертанта способност за композиране на цялостен причинно-

следствен анализ върху проблема. Що се отнася до непосредствения обект на изследване - всички свързани с термодинамично-структурни и функционални параметри на клаудин-12 са детайлно разгледани.

Коментарите, анализите и интерпретациите, направени в дисертационния труд на Десислава Колчакова, манифестират добро познаване на проблема.

Методика на изследването

Съчетанието от методики в представената работа подсказва зрял замисъл на проекта и без заложен методологични предизвикателства, гарантира висококачествено ниво на проучването и обещава достоверност на получените данни. Концептуалната постройка на работата включва широка методологична платформа: изследване антитуморна активност на три вещества от групата на s-триазините спрямо клаудин-12-експресиращи и клаудин неекспресиращи клетъчни линии; значителен списък от клетъчни линии, използвани за регистрация на последното; имунохистохимични изследвания; Western blot; *In vitro* тестове за анализ на цитотоксичност, антитуморна активност, клоногенна ефективност и клетъчна пролиферация; тестове за измерване концентрацията на АТФ; *in vitro* регистрация и анализ на клетъчна миграция, реализирано върху плаки Corning® HTS Transwell, включително тест с конкурентно инхибиране за изследване на клетъчна миграция; поточна цитометрия (FACS). Методите са детайлно описани и онагледени. Статистическият анализ е реализиран чрез подходящи тестове и дава възможност за коректна обективна оценка на данните.

Гореописаната технологична композиция от методи илюстрира логиката в търсенията на дисертанта и е приемлива за получаване на адекватен отговор на формулираните задачи.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Литературният обзор е разчетен в оптимален обем по отношение на труда (22 страници) за очертаване рамките на наличния изследователски опит, утвърдени тези, както и „бели петна“ по проблема. Следвайки логиката на експерименталните търсения, дисертантът е композирал и целенасочен литературен обзор, съдържащ систематизирана информация за междуклетъчните контакти (компонент с водеща роля в последващите анализи и експериментални търсения, свързани с *клаудин*), в това число- характеристики на интегралните протеини, участващи в осъществяването им: конексини, интегрини, кадхерини, оклудини, клаудини и др. В добра последователност са коментирани и онагледени плътните междуклетъчни контакти, тяхната бариерна функция по отношение на епителните клетки (в параграф 2.5 подробно са дефинирани функциите на протеините от групата, като дисертантът е построил справката диференциално по отношение на всеки тип *клаудин*, 1 – 19 *форми*). Разгледани и илюстрирани са структурните особености на типовете клаудинии тяхната експресия, наред с ролята им в контекста на планираните изследвания, генното им кодиране, отношението към клетъчната адхезия, агрегацията на протеини, вътреклетъчната сигнализация и морфологични промени в клетките. Регулацията в експресията на клаудините, свързана с цитокини и растежни фактори е съществен елемент от предварителния анализ на постиженията на емпиричния опит по темата. Обобщенията на дисертанта синтезират необходимият спектър от параметри, допълвайки детерминиращи проблема механизми: епигенетичната и микроРНК регулация на експресията на клаудини, транскрипционна и посттранскрипционна им регулация.

Формулировката на целите и задачите отразява в цялост идеята на научното търсене. Направена е точно и ясно

Описаните в работата резултати съответстват логически на заложеният първоначално план на работа и притежават доказателствена стойност по отношение на изказаните хипотези. Изборът на двете подходящи клетъчни линии (критерий – ниво на експресия на клаудин-12) и контролната е направен след предварителна серия експерименти. Параграфът е оформен в обем от 26 страници, изчерпателно онагледени с 18 фигури с висока плътност на информативност и 2 таблици.

По отношение значимостта на клаудин-12, като фактор в миграционните клетъчни явления, като недвусмислен резултат е посочено че, че клаудин-12 в състава на плътните контакти, участва в миграцията на тези клетки, които го експресират.

Важен резултат от експериментите е наблюдението свързано с отдиференциране на некротични и апоптотични ефекти при A549 и LS180 линии, носещо недвусмислени доказателства за проява на апоптоза.

Миграцията на Jurkat-клетки, регистрирана като зависи от присъствието на мембранен клаудин, е изследвана с цел изясняване параметри на фундаментален проблем – метастазирането на туморни образувания. Подробното изследване е позволило на дисертанта да получи данни за участие/неучастие на екстрацелуларни домейни на клаудин-12 в процеса на медиране миграцията на клетки през плътните контакти.

Като свързващ аспект към ролята на изследвания трансмембранен протеин за туморогенезата, са получени ценни данни по отношение инхибиторен ефект на трисхидроксиетилизоцианурова киселина и трихлороизоцианурова киселина и CDMT върху клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-неекспресиращи клетъчни линии. Експериментите са направени върху четири човешки клетъчни линии. Осъществени са МТТ и NR тестове, определени са IC50 стойности за клоногенност. Тази част от резултатите съдържа значима по обем и важност информация, продукт на съчетанието на множество тестове, включително такъв за повлияване вътреклетъчна концентрация на АТФ от различни дози на инхибиторите, даващи основание да се приеме силно изразен биохимичен, митотичен и морфологичен ефект на CDMT върху изследваните клетъчни линии.

Добро цялостно впечатление прави присъствието на пояснителни аналитични коментари при представянето на резултатите.

Обсъждането (9 страници) на дисертационния труд стартира грамотно с обилни данни за двупосочността в интензитета на експресия на клаудини при различни типове клетки и тъкани, както и доказаната промяна в регулацията на експресията им при развитие на различни новообразувания и най-важното – метастазирането, като водещ летален фактор.

Горното трасира изграждането на добра причинно-следствена връзка в анализа на данните от страна на дисертанта. В издържан причинно-следствен маниер е построено обсъждането на получените резултати, експонирани критично върху наличните научни доказателства, в това число: капацитетът антителиата срещу клаудин-12 да инхибират метастатичния процес в тъканите, експресиращи клаудин-12, свръхекспресията на клаудин-12 в цитоплазмата, ролята на клаудиновите протеини като потенциална мишена за антитуморна терапия, ролята на клаудин-12 за миграцията на ракови клетки през CLDN12-експресиращи тъкани в процеса на метастазиране, промени в сензитивността на организма към химиотерапия, цитотоксичното и антитуморно действие на подбрани от дисертанта вещества, върху клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-неекспресиращи клетки. Направен е

детайлен анализ на функционалните характеристики на въпросните вещества, свързани с техни структурни особености.

Адекватно мотивиран и анализиран е изборът на субстанциите в изследванията, като е направен паралел с едностранчивите акценти на досегашните изследвания, фокусирани основно върху високомолекулни съединения.

Добре аргументиран е вариантът на съчетание на подобрите от дисертанта методи с оглед на възможността да бъдат анализирани по обективен начин получените резултати. С премерена доза критичност са коментирани както дефицитът на данни в някои фрагменти от проблема, така и необходимостта от точно дефинирани бъдещи изследвания.

Приносите на дисертационния труд са несъмнени. В представеният вариант те са формулирани точно и съдържателно и изграждат много добра представа за успеха на експерименталната стратегия на екипа – *научна новост* с фундаментален принос в изследванията са:

- експерименталните доказателства, че блокирането на клаудин-12 води до значително редуциране на клетъчната миграция, съответно на туморните метастази;
- липсата или блокирането на клаудин-12 предотвратява преминаването на туморни клетки през междуклетъчните контакти, което би имало инхибиращ ефект за процеса на метастазиране;
- блокирането на клаудин-12 води до индуциране на апоптоза и съответно инхибиране на клетъчната пролиферация при експресиращи го туморни клетки;
- участието на клаудин-12 в модулиране на антитуморното действие на някои нискомолекулни вещества от групата на s-триазините.

Както и конкретни приложни идеи, свързани с:

- възможност за използване на клаудин-12 като таргетен протеин за блокиране на туморните метастази при лечение на определени туморни заболявания или като диагностичен маркер за специфични тумори.

Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Прегледът на публикационната продукция на докторанта недвусмислено демонстрира значително широк диапазон на научни интереси, обхващащ теми касаещи: изучаване механизми, свързани с активността на имунокомпетентните клетки при алергии, роля на някои ензими при развитие на ревматоиден артрит, биомаркери при остеоартроза и др.

Като непосредствено свързани с дисертационния труд са приложени две публикации в международни издания на английски език /едната с импакт фактор/ в екип съответно от трима и двама други изследователи, както и представяне на национален конгрес по имунология.

Структурата и стилистиката на представените материали – публикации и дисертационен труд подсказват, че Десислава Колчакова е с водеща роля в реализацията на настоящия проект. Несъмнено, хармонично изградената съвместна работа с научните ръководители е позволила извличане и дефиниране на задълбочени заключения относно обективната приложимост на резултатите от проучването, формулирани като приноси, отразяващи реални научни достижения.

Авторефератът отразява коректно и илюстрира изчерпателно съдържанието на дисертационния труд в аспект на получените резултати, отговаряйки на изискванията на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Всяко оформление на подобен труд е съпътствано с технически или пропуски от друг характер. По отношение на настоящия, имам някои коментари и забележки:

1. В параграф „Цел и задачи“ една от задачите дублира почти дословно самата цел, което е неприемливо!
2. Формулировката: *„Целта на настоящото проучване е да се изследва участието на клаудин-12 в процеса на клетъчна миграция, както и да се оцени възможността този протеин да се използва като специфична цел за регулиране на туморогенезата и инхибиращия ефект на вещества с антитуморно действие.“* съдържа стилистично повторение и макар подтекстът да е ясен, предизвиква известно смущение.
3. В параграф „Резултати“ са маркирани данни, които все още не са публикувани – индикация, че екипът продължава да работи по темата и предстоят нови събития свързани с това. Горното удостоверява в още по-голяма степен перспективността на работата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Факултета по Биология, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Десислава Иванова Колчакова, притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност *Клетъчна биология* като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“** на Десислава Иванова Колчакова в област на висше образование: 4: „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3: „Биологически науки“, докторска програма „Клетъчна биология“.

05.07.2021 г.

Изготвил становището:

(проф. д-р Валентин Турийски)