

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Василий Щерев Ишев, пенсионер, Медицински университет – Пловдив, област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3. Биологически науки (Биология)

Със Заповед № Р-33-2154/11.06.2021 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ съм определен за член на Научно жури по процедура за защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“.

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологични науки

Научна специалност: Клетъчна биология

Автор: Десислава Иванова Колчакова – редовен докторант към Катедра „Биология на развитието” на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Тема: „Функционален анализ на протеина клаудин при туморни клетъчни линии“

Научни ръководители: проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов и доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, Биологичен факултет, Катедра „Биология на развитието”.

1. Общо описание на представените материали

Представеният от Десислава Иванова Колчакова комплект материали на хартиен и електронен носител са в съответствие с Член 36 (1) от Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“ за развитие на академичния състав и включва следните документи:

- Молба до Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- Автобиография в европейски формат;
- Протокол от заседание на Катедрения съвет при Катедра „Биология на развитието“, проведено на 20.05.2021 г. и свързано с докладване на

готовността за процедурата 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 Биологическия факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“.

2. Кратки биографични данни за докторанта

- **Образование и обучение:** 2006-2011 г. - Немска езикова гимназия „Бертолт Брехт“ гр. Пазарджик; 2011-2015 г. - Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“ – Бакалавър по биология; 2015-2016 г. - Катедра „Биология на развитието“ при ПУ: магистър по Репродуктивна биология с квалификация Биолог-ембриолог; 2017-2020 г. - редовен докторант по Клетъчна биология.
- **Професионален опит:** Медицински център „Афродита“- официален представител на английска банка за съхранение на стволови клетки (2013-2015 г.); Асистент по Клетъчна биология Катедра „Биология на развитието“ при ПУ „Паисий Хилендарски“ (2019-2020 г.); Търговски представител към тъканна банка СелсФорГуд ЕООД и Мениджър проучване на пазари в Лоджикам Груп (2020 г.).
- **Чужди езици:** немски и английски език - добро владение.
- **Научни публикации, научни симпозиуми и научни проекти:** Приложени са: три съвместни **научни публикации**, две от които с импакт фактор 2.762, Q1 и 4.082, Q1, отпечатани между 2018 г. и 2021 г. в реномирани международни издания; доклад пред **Пети национален конгрес по имунология**, Пловдив, 2018 г.; от 2019 г. до 2022 г. - участие в три финансирани **научни проекта**, един от които международен, по програма за двустранно сътрудничество България-Австрия (приключва през 2022 г.).

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цел и задачи

Интересът на клетъчни биолози, хистолози и онколози към откритите през втората половина на ХХ век плътни междуклетъчни контакти нарастна значително през последните двадесет години. Съвременни проучвания сочат,

че участващите в плътните междуклетъчни контакти протеини от семейството на клаудините, играят важна роля при нарушаването на целостта на епителните тъкани. При наличие на раково израждане, това може да доведе до миграция на променените клетки и възникване на метастази.

Има данни, че повишената секреция на един от тези протеини, клаудин-12, увеличава метастазирането на бронхиалните епителни клетки, но механизмът на миграция през плътните контакти, както и евентуалното въздействие на вещества, потискащи канцерогенезата, не са изяснени. Затова тематиката на дисертационния труд е извънредно актуална както от научна, така и научно-приложна гледна точка и, според мен, тя е свързана, на първо място по важност, с навременното лечение раковата болест.

Целта на дисертационния труд е проучване участието на клаудин-12 в процеса на миграция и оценка на възможността този протеин да се използва като специфична цел за регулиране на туморогенезата и инхибиращия ефект на вещества с антитуморно действие.

За изпълнението на тази цел прецизно и изчерпателно са формулирани девет **задачи**.

Поставените цел и задачи са целесъобразни.

Познаване на проблема

Докторантът отлично познава проблема и творчески анализира и оценява литературните данни. В библиографската справка са включени 174 литературни източника, 173 от които на латиница.

Литературният обзор е представен в седем раздела, в които многостранно и убедително е обоснована актуалността и значимостта на разработената тематика.

4. Материали и методи

Получени са синтетични пептиди, съответстващи на двата извънклетъчни домейна на клаудин-12. Експресията на клаудин-12 е изследвана в *in vitro* култури от девет човешки туморни клетъчни линии чрез имуноцитохимични тестове и Western blot анализ. Приложен е МТТ тест за оценка на клетъчната пролиферация при клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии след третиране с анти-клаудин-12-антитела. Ролята на клаудин-12 за клетъчната миграция в монослоевете е оценена с

помощта на МТТ тест. Проучена е възможността анти-клаудин-12-антитела да предизвикат апоптотична клетъчна смърт като за целта е проведено оцветяване с флуоресцентен изотиоцианат (FITC) и пропидиев йодит (PI) и последващ поточен цитометричен анализ (FACS). Изследвани са цитотоксичният и потенциалният противотуморен ефект на s-триазини с МТТ тест и NR тест. Проведени са *in vitro* тестове за клоногенна активност, конкурентно инхибиране и клетъчна виталност. Клетъчната концентрация на АТФ е измервана със стандартен кит на базата на биолуминисценция. За микроскопско наблюдение са ползвани флуоресцентен и инвертен микроскоп. Всички данни от проведените експерименти са подложени на статистически анализ.

Можем да обобщим, че от методологична гледна точка подходът за решаването на поставените цел и задачи е правилен. Приложената методика позволява постигането на поставената цел и съответстващ отговор на задачите в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан съобразно общоприетия модел и съдържа 106 страници, 2 таблици и 24 фигури. Богатият илюстративен материал онагледява резултатите и има доказателствена стойност.

Целта и задачите са ясно дефинирани. Използваните материали и обекти на изследване са сполучливо подбрани. Приложените най-съвременни изследователски методи са надлежно описани и прецизно изпълнени. Получените резултати са с висока степен на достоверност. Те са обсъдени компетентно и задълбочено, което потвърждава отличната теоретичната подготовка, аналитичните способности и инвенцията на докторанта. Изводите са добре аргументирани и съответстват на поставените цел и задачи.

На основа на резултатите са направени следните изводи:

- клаудин-12 се експресира при туморни клетъчни линии с епителен произход, изолирани от бял дроб и дебело черво;
- виталността и пролиферацията на туморните клетки се контролира от механизми, в които участва клаудин-12;
- клаудин-12 има роля в процесите на миграция на клетките, които го експресират;

- клаудин-12 участва в миграцията по време на метастазиране;
- метастатични левкемични клетки използват лимфоцитния функционално асоцииран антиген (LFA-1) и/или CD61L за да мигрират през плътните контакти между клетки, експресиращи клаудин-12;
- първият извънклетъчен домейн на клаудин-12 участва във взаимодействия, медиращи миграцията през плътните контакти;
- клаудин-12 участва в модулирането на антитуморното действие на някои нискомолекулни органични вещества от групата на s-триазините;
- трихлоризоциануровата киселина проявява селективен антитуморен ефект спрямо клаудин-12-отрицателни HeLa клетки;
- механизмът на токсично действие на 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин спрямо клаудин-12-експресиращи клетки от клетъчна линия A549 е различен от този при клаудин-12-отрицателни туморни клетки.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Рецензията от мен дисертационен труд е научно изследване, довело да правилно изведени и точно формулирани изводи. Приносите обогатяват биологичната наука и медицинската практика в област с голяма обществена значимост.

Оригинални научни приноси:

1. За първи път е изследвана ролята на протеина клаудин-12 за миграцията на туморните клетки, които го експресират като е демонстрирано, че блокирането на този протеин води до значително редуциране на клетъчната миграция, съответно на туморните метастази.

2. За първи път е изследвана ролята на протеина клаудин-12 за миграцията на туморните клетки през формиращи клетъчни слоеве, съдържащи плътни междуклетъчни контакти, в които участва клаудин-12 като е показано, че липсата или блокирането на клаудин-12 предотвратява преминаването на туморните клетки през междуклетъчните контакти, което би имало инхибиращ ефект за процеса на метастазиране.

3. За първи път е изследвана ролята на протеина клаудин-12 за виталността на клетките, които го експресират като е показано, че неговото

блокиране води до индуциране на апоптоза и съответно на инхибиране на клетъчната пролиферация.

4. За първи път е изследвано участието на клаудин-12 в модулирането на антитуморното действие на някои нискомолекулни вещества от групата на s-триазините.

Научни приноси с потвърдителен характер:

Потвърдена е експресията на клаудин-12 при туморни клетки с епителен произход, изолирани от бял дроб и дебело черво.

Научно-приложни приноси

Участието на клаудин-12 в процеса на клетъчна миграция дава възможност за използването му като таргетен протеин за блокиране на туморни метастази при лечение на определени туморни заболявания или като диагностичен маркер за специфични тумори.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантът е представил три съвместни научни публикации, две от които съдържат фрагменти от дисертационния труд и са на високо научно ниво. На едната от тях докторантът е първи автор, а на другата - втори автор.

9. Лично участие на докторанта

Личното участие на докторанта в разработването на дисертационния труд и формулираните приноси е несъмнено. Дисертационният труд е добре обмислен и прецизно осъществен. Докторантът умело анализира получените резултати в светлината на литературните данни и формулира достоверни изводи, отчитайки възможностите за практическо приложение на установените зависимости.

10. Авторефератът като неразделна част от дисертацията, отразява в резюмиран вид основните ѝ положения и дава реална представа за проведените изследвания, получените резултати и направените изводи. Оформен е според изискванията на съответните правилници и е много добре онагледен.

11. Критични забележки и препоръки

Нямам критични бележки към проведените изследвания и представения комплект материали, свързани с дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и **отговаря на всички изисквания** на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагането му.

Дисертационният труд показва, че докторантът Десислава Иванова Колчакова притежава задълбочени теоретични знания по клетъчна биология, професионални умения и способност за самостоятелно провеждане на най-съвременни научни изследвания.

Като се основавам на гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено в рецензираните от мен дисертация, 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. Биологични науки,**

научна специалност: **Клетъчна биология.**

21.06.2021 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(Проф. д-р Василий Ишев д.м.)