

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Таня Георгиева Димова,
Институт по биология и имунология на размножаването, БАН
по дисертационния труд на Силвия Любенова Брадянова, редовен докторант в
Институт по микробиология, БАН
на тема: „Функционално потискане на автореактивни Т клетки
чрез антицялова терапия при миши и хуманизиран NSG
модели на Системен Лупус Еритематосус”

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност
„Имунология”, 01.06.23

Представеният ми за становище труд е изключително актуална и задълбочена разработка в една област с подчертано клинично и социално значение – автоимунните заболявания. Цел на настоящия труд е да запълни част от празнината в съвременните познания и търсене на терапевтични подходи при едно такова заболяване, а именно системния лупус (СЛЕ), хронично автоимунно възпалително заболяване с мултисистемна патология. Заболяването трудно се диагностицира поради вариация в симптомите и припокриването му с други заболявания, което е причина за закъсняла и в повечето случаи неспецифична терапия. Дисертационният труд е посветен на ролята на автореактивните Т клетки в патогенезата на заболяването с директните им ефекти и индиректни такива върху В лимфоцитите. Хипотезата на докторантката е, че е възможно модулиране на пролиферацията и функцията на автореактивни Т клетки чрез таргетиране на анексин 1 (ANX A1) върху повърхността им и като следствие потискане на автореактивни В клетки и потушаване симптомите на СЛЕ. За проверка на тази хипотеза се използват 3 типа миши модели на СЛЕ – спонтанен (MRL/lpr мишки), пристан-индуцируем и хуманизиран. Дисертационният труд на С. Брадянова е представен на 114 страници, като е спазена традиционната структура: съдържание, списък на съкращенията и увод - 7 стр., анализ на литературните данни – 27 стр., цел и задачи – 2 стр, материали и методи – 15 стр., резултати - 34 стр., обсъждане - 8 стр., изводи, приноси и библиография. Богатата библиографията включва 193 източника, от които половината са публикувани през последните десет години. Представени са 42 фигури и 2 таблици. Спазени са всички законови изисквания и етични норми при проучвания със животни. **Уводът** целенасочено въвежда в проблема. Литературният обзор разглежда многостранно проблема за автоимунните заболявания и в частност СЛЕ – симптоматика, патогенеза, полово детерминираност, диагностика и терапия. Особено внимание е обърнато на ролята на Т и В лимфоцитите в патогенезата на заболяването. Докторантката насочва вниманието на читателя към последните постижения в терапията на заболяването и иновативните протоколи за лечение базирано на имунотерапия с индивидуализиран подход. Така естествено се акцентира върху молекулата от интерес ANX A1, за която вече има данни за имуномодулаторен ефект. Описани са подробно и експерименталните миши модели на системен лупус. В тази част забележките ми са чисто технически – използваните схеми от чужди

източници изискват кратко описание в легендата на фигурите (фиг.1-4, 7) и Фигура 9 не е с много добро качество. Бих приветствала представянето на хипотезата под формата на инфографика. Нетрадиционно, са поставени 2 цели на дисертационния труд и съответно две групи задачи, продиктувано от използването на повече от един модел и вероятно да улесни изложението на резултатите. Според мен целта е една и съща, независимо от използваните модели и задачите в двете групи се припокриват (1-ва и 6-та, 2-ра,3-та и 8-ма, 4-та и 9-та, 5-та и 7-ма). Смятам обаче, че докторантката е в правото си да дефинира целта/целите на труда си съобразно с нейните разбирания. Раздел **Материали и методи** също е поделен на две и така едни и същи методи се повтарят два пъти, което излишно утежнява текста. Добро впечатление прави онагледяването на опитните постановки чрез схеми. Впечатлена съм от богатата методология, използвана в дисертацията. Използвани са релевантни, информативни и съвременни методи, които са подбрани така че да осигурят комплексен подход към проблема. Имам забележки относно протоколите за Т-клетъчна стимулация към пролиферация и по-точно времето и начина за стимулация, което да осигури оптимална експресия на ранния и късния активационни маркери CD69 и CD25 съответно. **Резултатите** също са разделени в две групи в зависимост от поставените две цели с кореспондиращите им задачи. Впечатлена съм от обема на извършената експериментална работа и получените резултати. В последните години рядко се наблюдават подобни дисертационни трудове за образователна и научна степен “Доктор” и бих искала да поздравя докторантката и научния ѝ ръководител. Въпреки че основният интерес на докторантката е насочен към ролята на Т клетките в патогенезата на заболяването са получени доста данни и за функцията на автореактивните Б клетки. Голямото количество резултати са представени на множество многопанелни фигури. Определено ме удовлетвориха фигурите, представящи резултати от FACS анализи заради комбинацията от репрезентативни факс плотове с графично представени статистически обработени резултати. Това е най-убедителния начин при представяне на подобни изследвания. Уменията на докторантката в описанието и дискусиата на резултатите и отличните ѝ познания за моделите, с които работи ме убеди, че тази голяма по обем експериментална работа е нейно дело. Според мен обилното количество получени данни заслужават по-обширна дискусия, но пък отчитам и факта, че проблематиката, засегната в дисертацията е нова и тепърва се разработва. Приемам формулираните от докторантката **изводи и приноси**, с леки резерви към извод 2.

Във връзка с него и като цяло имам няколко въпроса към докторантката:

1. Защо в експериментите със стимулиране на спленоцити от пристан- или PBS-инжектирани Balb/c мишки за проследяване на Т-клетъчна пролиферация времето за стимулация е 28 часа (стр.41), в експериментите за стимулиране на РВМС, изолирани от пациенти с лупус и от здрави донори е 4 дни (стр. 48), а в експериментите със спленоцити от миши модел за спонтанен лупус (MRL/lpr) - 5 дни (Bradyanova S et al 2021)? Има ли някаква специална причина да не добавяте IL-2 и смятате ли, че сте осигурили оптимална експресия на късния активационен маркер CD25?

2. Защо в експериментите за проследяване на ефектите на анти-ANX1 антитялото върху Т-клетъчната пролиферация използвате като контролна стимулация с LPS или PMA/Ionomycin?
3. Убедете ме, че измерването на пролиферация с МТТ е подходящо. Защо за някои анализи абсорбцията на разтворения формазан, измерена при дължина на вълната 590 nm е коригирана чрез изваждане на абсорбцията при 620 nm (Фиг. 18), а при други не (Фиг. 17)?
4. За съжаление жените в репродуктивна възраст са по-предразположени към заболяване от СЛЕ. Имате ли поглед върху най-новите научни данни дали жените със СЛЕ трябва да избягват бременност поради опасения за обостряне на заболяването и/или неблагоприятен развой на бременността?

Считам, че по своето съдържание и структура авторефератът напълно отговаря на изискванията, като отразява изчерпателно и точно съдържанието на дисертацията.

По дисертацията има публикувани две статии в Q1 и в Q2, едната от които вече е със 16 цитата.

Въпреки, че моята задача бе да направя оценка на дисертационния труд не мога да остана безучастна към отличните наукометрични данни на докторантката. До момента тя има 12 научни публикации, всичките в реферирани списания, от които 7 в Q1, 4 в Q2, 1 в Q3. В 5 от общо 12-те публикации С. Брадянова е първи или втори автор. Има 37 участия в научни форуми, участвала е в изработването на 17 научни проекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за становище дисертационен труд е съвременна и навременна научна разработка в областта на СЛЕ и възможности за имунотерапия, с разумно поставени цели и задачи, богата и релевантна методология, логична структура и добро изпълнение. Дисертацията успява да даде отговори на повечето поставени въпроси и да отвори нови полета за изследвания във фундаменталната и клиничната сфери. Дисертационният труд отговаря на всички изисквания, поставени в ЗРАСРБ и неговия Правилник, както и на специфичните изисквания на Правилниците на БАН и на Института по микробиология. Въз основа на всичко казано дотук, моята оценка е **ПОЛОЖИТЕЛНА** и препоръчвам убедено на уважаемите членове на научното жури да присъдим образователната и научна степен “Доктор” на Силвия Любенова Брадянова по научна специалност „Имунология”, в направление Биологически науки, област на висше образование Природни науки, математика и информатика.

София, 14.07.24 год.

Доц. Таня Димова