

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, подготвен за присъждане на образователната и научна степен
'Доктор'

от доц. Петя Асенова Димитрова, Лаборатория по експериментална имунотерапия,
Департамент по имунология, Институт по микробиология "Стефан Ангелов"

избрана за член на Научното жури със Заповед № I-88/26.06.2024г. г. от Директора на
Институт по микробиология, БАН и за рецензент от Научното Жури с Протокол №1/
04.07.2024г.

Дисертационен труд с автор: Силвия Любенова Брадянова

Тема: Функционално потискане на автореактивни Т клетки чрез антицялова терапия при миши и хуманизиран NSG модели на Системен Лупус Еритематосус

Научен ръководител: проф. д-р Андрей Чорбанов

Направление: 4.3. Биологически науки (Имунология)

1. Общо описание на представените материали

Авторът на дисертационния труд Силвия Брадянова е докторантка в редовна форма на обучение към Лаборатория по експериментална имунология на Департамент „Имунология“, Институт по микробиология, БАН, с научен ръководител проф. Андрей Чорбанов. Силвия Брадянова е представила на хартиен носител и в електронен вариант, съответните документи, според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ-БАН, а именно: заявление за допускане до защита, копие от завършена магистърска степен (специалност Биотехнологии/Генно и клетъчно инженерство, Биологически факултет, Софийски университет), заповед за зачисляване (I-171/21.12.2016), заповед за удължение от една година (I-134/27.12.2019), заповед за отчисляване с право на защита, считано от Януари 2021г. (I-10/28.01.2021), протоколи от изпити (английски, първи и втори минимум по специалността) и курсове по специалността (Potoshop, курс „Увод в клетъчното и тъканно инженерство“, курс „Молекулни механизми на канцерогенезата“), справка за получените кредитите според изисквания на ИМикБ-БАН (общо 698 кредита от минимални 250 кредита), протокол от предзащита (№4/24.06.2024) и предварителна рецензия на дисертационен труд, дисертационен труд и автореферат на български, списък на публикациите (2 статии в Clin Exp Immunol (Q2) и Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Q1)) и цитиранията (общо 16), декларация за оригиналност и автобиография.

2. Актуалност на тематиката

Автореактивността се дължи на комбинация от „грешки“ в различни механизми, използвани за поддържане на толерантността към собствени антигени в първичните и вторичните лимфоидни органи. Установената е хетерогенна група от повече от 80 клинично доказано системни (напр. системен лупус еритематозус) или органоспецифични (напр. множествена склероза) заболявания, които споделят общи характеристики, като реактивност на Т клетки и антитела към собствени антигени и обща връзка с определени генетични варианти в HLA (Harroud, Adil, and David A Hafler. Science (New York, N.Y.) vol. 380,6644 (2023): 485-490).

Нарушаването на централната толератност чрез дефект в AIRE и/или индуциране на толерантност по време на формирането на автореактивни клонове в първичните органи води до образуване на автореактивни Т клетки, които могат да се мобилизират към периферните лимфоидни структури. Там настъпва следваща грешка и нарушаване на периферната толератност чрез избягване на анергията на тези автореактивни клонове и съответно нарушаване на планираната за тези клонове апоптоза. Възможно е и допълнително игнориране на автореактивните клонове, които продължават да съществуват в периферията, поради анергия или дисфункция на регулаторни клетки, контролиращи директно или индиректно броя и функцията на Т и В клетъчните популации. Различни генетични фактори (наличие на определени хаплотипи HLA и асумулиране на редки варианти в популацията на HLA, IL-2RA и други) и промени в средата (с рискови фактори хранене, тютюнопушене, инфекция с Epstein-Barr вирус) може да опосредстват автоимунитета. В периферията може да се поддържа хронично възпаление с тъканно увреждане, при което се появяват скрити антигени, да има мимикрия на вирусни/бактериални протеини, поради използване на специфични стратегии за избягване на имунитета от патогени, използващи и/или имитиращи ключови процеси в клетката гостоприемник. Поради това че, заболяването е полигенно и със сложна патофизиология, единичен терапевтичен подход при него не е ефективен до този момент и затова по-скоро се прилага алгоритъм на лечение с различни стратегии, за да се поддържат пациентите в по-дълга ремисия. Това налага търсенето на нови подходи за терапия все още актуално, както и на възможности за комбинация с конвенционалното лечение.

3. Целесъобразност на поставените цели и задачи

В дисертацията на Силвия Брадянова са поставени 2 цели, като основанието за това е по-фокусирано представяне на резултатите и дискусиата. Първата цел е да се докаже, че чрез таргетиране на Т клетките с анти-ANX A1 антитяло се повлиява развитието и симптомите при два експериментални модела на лупус. Втората цел е потвърждение на потенциала на анти-ANX A1 антитялото при хуманизиран модел в NOD-SCID gamma (NSG) мишки, където след трансфер на клетки от пациенти с SLE се наблюдава отлагането на имунни комплекси в бъбреците и компроментиране на бъбречната функция при животните, реципиенти на автореактивните лимфоцити. Към всяка цел има 5 задачи, които са формулирани, съобразно поставените цели. Прави впечатление обемът на поставените задачи – общо 10, които включват трудни експериментални постановки ин виво, което показва нуждата от натрупване на специфичен експериментален опит на докторантката при работа с животните и анализ на данните. В допълнение експерименталните задачи ин виво включват и многокомпонентен анализ – изследване на фенотипа на Т и В клетки, изследване за нива на автореактивни антитела, изследване за двДНК специфични В лимфоцити, продукция на цитокини и наличие на имунни комплекси в бъбреците.

4. Познаване на проблема

Докторантката Силвия Брадянова демонстрира добро познаване на изследванията на други колективи в областта и включва в обзора и дискусиата 12 литературни източника за 2020 г., 10 литературни източника, публикувани през 2021 и 3 ключови изследвания за Т лимфоцити при СЛЕ от 2023 г. Литературният обзор е написан компетентно и стегнато, като са приложени 9 фигури, които онагледяват важни механизми и взаимоотношения на клетъчно ниво при СЛЕ. Според мен Фигура 9. за Молекулни механизми на кортикостероидите при СЛЕ не носи нова информация и би могла да не бъде включена. В обзора има 1 таблица, която е много информативна и лично на мен ми допадна, тъй като систематизира всички модели на СЛЕ. Всъщност личи, че Силвия отлично познава мишите модели на СЛЕ – индуциреми, спонтанни, хуманизирани и това, според мен е

много силен акцент в литературния обзор и в дисертацията, като цяло. Много на място е описано и кои антитела са част от патологията при експерименталните модели и личи, че Силвия заедно с останалите колеги от Департамента са едни от малкото изследователи в България, които използват експериментални модели за преклинично доказване на терапевтичен ефект на нови терапии при СЛЕ.

Добро впечатление оставя и желанието да се изгради хипотеза, в края на литературния обзор, въпреки че според мен може да бъде по-добре формулирана.

5. Методика на изследването

Докторантката използва разнообразна методология. Методите са разделени на 2 подточки, такива използвани при експериментален модел на лупус при мишки и такива, свързани с експерименталната работа при хуманизиран модел на СЛЕ. Описани са прецезно използваните експериментални животни и схемата на третиране при двата експериментални модела. При хуманизирания модел има данни за пациентите със СЛЕ и здравите донори, включени в настоящата дисертация – извършена е характеристика на двете кохорти по пол, години и здравен статус. Прави впечатление използването на разнообразни антитела, и е описана техниката за биотинилиране на антитела – необходима за получаване на маркирано с биотин анти-ANX A1 антитяло. Използвани са техники за изолиране на миши клетки от слезка, на човешки периферни мононуклеарни кръвни клетки (PBMC) от кръв и трансфер на клетки в реципиентните животни, техники за получаване на плазма. Използвани са имунологични методи като фенотипизиране на клетки чрез проточна цитометрия, определяне на нивата на цитокини в серум, клетъчна пролиферация и апоптоза. Използвани са методи за количествено определяне на свързаните с патологията на СЛЕ автоантитела чрез ELISA (нива на анти-двДНК IgG антитела в серум) и ELISpot анализ за преброяване на двДНК специфични В клетки. Използвани са методи за оценка на бъбречните увреждания – измерване на протеинурия (бъбречна дисфункция); хистологичен анализ (охарактеризирани и полуколичествено са оценени патологичните промени в бъбреците) и имунофлуоресценция за идентифициране на отлагания на имунни комплекси в бъбреците. Извършен е качествен анализ за автоантигени в серум чрез микрочип техника. Статистическите методи, са адекватни и гарантират повторяемост на получените данни.

Определено експерименталната работа на Силвия и практическите умения, които тя е придобила биха и дали предимство в бъдещото и кариерно развитие и отлична подготовка за планиране на нови експериментални задачи при реализиране на научни проекти.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационния труд има структура според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ, БАН, а именно съдържа следните глави:

- Заглавие
- Използвани съкращения
- Литературен обзор, обозначен като Увод – 26 страници, с подраздели за теоретичен преглед на автоимунитет и автоимунни заболявания, патофизиология на системен лупус еритематозус, биологично значение на анексин А1, подходи за лечение, миши модели на системен лупус, хипотеза.
- Цели и задачи – 2 страници, с поставени 10 задачи
- Материали и методи – разделени са на 2 подточки и голям набор от техники, описани на 15 страници и онагледени с 3 фигури, демонстриращи схемата на третиране на животните

- Резултати – 34 страници, 29 фигури с по няколко панела (обикновено 4-6 панела), Приложена е 1 таблица с данни от СЛЕ пациентите и здравите донори.
- Дискусия – 8 страници
- Изводи – 1 страница
- Приноси – 2 страници –разделени на приноси с фундаментале и научно-приложен характер
- Литературни източници – 193 източника, повечето от които са на статии, публикувани в периода 2018-2024 г.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Според мен приносите на дисертацията са:

- Приноси с фундаментално значение
1. Анексин А1 се експресира от Т лимфоцити изолирани от мишки с индуциран или спонтанен експериментален лупус и от РВМС, изолирани от пациенти с СЛЕ.
- Приноси с научно приложен характер се описаните с докторантката приноси
1. Въведен и оптимизиран е хуманизиран модел на лупус при NSG мишки
 2. Установена е различна чувствителност на мишки третирани с антитяло срещу Анексин А1 в ранна и късна фаза на развитие на спонтанен СЛЕ.
 3. Терапевтичният ефект на Анексин А1 при СЛЕ се дължи както на директен инхибиращ ефект върху преживяемостта, апоптозата и активирането на Т лимфоцити, така и на Т-клетъчно независимо действие върху В лимфоцитите и продуцираните от тях автоантитела.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантката има 2 публикации, от които в 1 е първи автор и е в списание с Q1. Втората публикация е в списанието Clin Exp Immunol на издателство Springer, което е едно от списанията с висок рейтинг в областта на имунология, въпреки че е с ранк Q2. В Acknowledgment section на статията е описан и безусловния експериментален принос в оформянето на статията на Силвия Брадянова. Тази статия има над 10 цитата, които Силвия е предоставила в дисертационни труд.

9. Критични забележки и препоръки

Моите въпроси към Силвия Брадянова са:

1. Какви биха били страничните ефекти от приложение на анти-Анексин А1 антитялото при SLE?

Критични забележки

- В дисертационни труд има терминологични неточности и недобре формуирани изречения – може би малко повече внимание е трябвало да се обърне на изказа в дисертацията,
- Можело е да се обърне внимание на по-плавни преходи, между отделните резултати и с коментър защо е планувана дадената експериментална постановка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Силвия Брадянова **съдържа научни, научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката** и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените дисертационни резултати съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИМикБ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че Силвия Брадянова **притежава** теоретични знания и професионални умения като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, и **предлагам присъждане на образователната и научна степен 'Доктор' направление 4.3. Биологически науки (Имунология) на Силвия Брадянова.**

15.07.2024 г.

Рецензент:

Доц. Петя Димитрова

(ак. дл. име фамилия)