

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р **Николина Михайлова Михайлова**, Лаборатория по имунохистохимия и имунопатология, Департамент Имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, Българска Академия на Науките

избрана за член на Научното жури със Заповед № I- 168/29.11.2024 г.от Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“

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** научна специалност „Имунология“

Автор: Емилия Захария Стоянова

Тема: Нов подход за лечение на миши модел на меланом чрез епитоп-специфично туморно инхибиране

Научен ръководител: проф. д-р Андрей Чорбанов

1. Общо описание на представените материали

Автор на дисертационния труд е Емилия Захария Стоянова – докторантка в редовна форма на обучение към Департамент „Имунология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, с научен ръководител проф. д-р Андрей Чорбанов.

Представеният за разглеждане комплект материали на хартиен носител и в електронен вариант, е в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на БАН за прилагане на ЗРАСРБ и отговаря на критериите на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

Докторантката е приложила 2 броя публикации по темата на дисертацията и съответния доказателствен материал, сертификати от участия в научни конференции. *Общата ѝ научна продукция е 4 публикации в международни списания, цитирани 10 пъти; h-индексът на докторантката е 2, по данни на Scopus.*

2. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

През последните десетилетия, кожният меланом показва рязко увеличаване в честотата на заболяемост и е с тенденция да се превърне от относително рядко онкологично заболяване в такова с нарастващо медицинско значение.

Последните статистически данни сочат значително нарастване на случаите на меланом в световен мащаб. От 2012 г. до 2020 г. броят на случаите се е увеличил с 41% - от 230 000 на 325 000. Наблюдава се тревожна тенденция за нарастване на заболяемостта с 3-5 % ежегодно в цял свят, включително и у нас. Този скок е най-силно изразен в региони, населени предимно с хора със светла кожа като Австралия и Нова Зеландия. Годишно около 600 човека в България се диагностицират с малигнен меланом. По данни на Европейската комисия най-

висока заболяемост от меланом в Европа има възрастовата група 45-69 години, а според статистически данни от САЩ - диагнозата меланом е една от най-честите в групата на младите възрастни /особено при младите жени/ и юношите /15-39 години/. Малигният меланом може да се развие дори и в най-ранна детска възраст. Основен рисков фактор за развитието на заболяването са ултравиолетовите лъчи и изгарянето на кожата от слънцето и изкуствени източници като солариуми, както и генетичната предразположеност.

Темата на дисертацията засяга важна и актуална област, насочена към търсене на нови и специфични терапевтични подходи при меланом като са представени експериментални данни за ефекта на протеинови епитоп-специфични ваксини съдържащи в състава си хемоцианини. Хемоцианините са големи дихателни протеини, които се намират в хемолимфата на мекотели и членестоноги и в последните години се изучават интензивно с оглед на техния потенциал срещу различни социално значими заболявания като тумори, вирусни инфекции и други, или на тяхната възможна употреба като адюванти за ваксини.

Един от най-добре проучените и с широко биомедицинско приложение хемоцианин е Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Поради големите си размери и множеството епитопи, той генерира силен имунен отговор, а изобилието от лизинови остатъци го прави много подходящ за белтък-преносител на хаптени за генериране на хаптен-специфични антитела. Той намира приложение и в различни ваксини срещу рак, включително неходжкинов лимфом, рак на гърдата и рак на пикочния мехур. Тези ваксини съдържат специфични тумор-свързани антигени, конюгирани с KLH, за да стимулират антитуморни имунни отговори, които могат да унищожат туморните клетки.

Тестването на нови терапевтични подходи за всякакви злокачествени заболявания разширява възможностите и дава надежда за справянето с този глобален здравословен проблем. Именно по тази причина, смятам че, представената тема на дисертация е изключително актуална и важна.

3. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд има структура според изискванията на Правилника за прилагане на закона за развитие на академичния състав на ИМикБ - БАН, а именно съдържа 129 стр., 52 фигури и библиографична справка, включваща 134 литературни източника. Структуриран е както следва:

- ✓ Заглавие
- ✓ Съдържание
- ✓ Използвани съкращения
- ✓ Увод – 1 страница. Дисертантката целенасочено въвежда основните аспекти и получени резултати в дисертационния труд.
- ✓ Литературен обзор – представен на 40 страници включващи 17 илюстративни фигури. Впечатлението ми от представения литературен обзор е, че Емилия познава много добре съвременното състояние на изследваните от нея проблеми. Използвани са 114 източника, 45 от които са от последните 5 години. Литературната справка е разделена в десет подраздела, като са приложени 17 фигури които онагледяват и допълват представената информация. За плавно въвеждане в тематиката, докторантката преминава през общите

аспекти на раковите заболявания и по-конкретно при меланома, обобщени са важни аспекти от противотумурния имунен отговор, като са представени основни моменти и имунни клетки с ключова роля във вродения и в придобития имунен отговор срещу раковите заболявания. В отделен подраздел, Емилия е представила двукратна роля на имунната система при развитието на тези заболявания, а именно осигуряването на имуносупресивна среда, която поддържа туморогенезата и насърчава туморния растеж.

Направено е обобщение на съвременните подходи за терапия на меланома, като са отчетени и недостатъците на тези терапии. Отделено е място и за възможностите на природни, биологично-активни молекули като противоракови продукти, с което докторантката въвежда и тематиката на представената дисертация. Отчетено е и значението на ин vivo моделите за тестване на нови потенциални терапевтични средства.

✓ Цели и задачи – Целта е точно дефинирана, като за постигането ѝ са изведени четири ясно формулирани и логически-свързани задачи:

1. Разработване на експериментален миши модел на меланома.
2. Изследване на анти-туморните свойства на RtH и NaH в B16F10 миши модел на меланома.
3. Синтез и химическо конюгиране на пептид (GD3P4), мимотоп на тумор-асоцииран въглехидратен епитоп (GD3), характерен за меланомни клетки към хемоцианиновите молекули и анализ на получените химерни молекули (RtH-GD3P4 и NaH-GD3P4).
4. Изследване на терапевтичния ефект на конструираните противоракови ваксини RtH-GD3P4 и NaH-GD3P4 при B16F10 миши модел на меланома и неговата значимост за преживяемостта на експерименталните животни.

✓ Материали и методи – Методологията използвана при разработването на дисертационния труд е нагледно представена на 16 страници и 8 фигури и отразява разнообразен набор от молекулярно-биологични, имунологични и хистологични методи, които са добре описани и дават възможност за възпроизводимост. Добро впечатление прави онагледяването на опитните постановки със схеми, което много улеснява читателя. Несъмнено е, че дисертационният труд представлява сериозно и задълбочено изследване, проведено на високо методологично ниво.

✓ Резултати – 34 страници, 27 комплексни фигури.

Представените резултати за разделени в три подраздела и отразяват заложените задачи. Подборът на подходяща схема за работа с моделната клетъчна линия, е от изключително значение за последващите експерименти, а именно колко клетки да се инокулират така че да се постигне максимално проявление на заболяването и в същото време диапазона на развитие да предостави възможност да се отчете максималния ефект от терапията. Представените резултати в първи подраздел показват точно това – инжектиране на меланомна клетъчна линия B16F10 в концентрация 1.5×10^5 клетки/животно води до 100% смъртност при нетретираните животни и възможност за терапевтичен прозорец от 3 месеца за проследяване на ефективността на терапията.

В следващата част от резултатите са представени данни за антитуморния потенциал на тествените хемоцианини при вече определения миши модел на меланом, но при три различни подхода на третиране – терапевтична, интензивна и схема с претретиране.

Третата част от резултатите представя дизайн и конструиране на антитуморни ваксини съдържащи GD3-мимитиращ пептид и хемоцианините RtH или NaH. Конструираните протеинови молекули отново са тествани и при трите подхода за терапия.

Извършена е огромна по обем работа. Резултатите са представени на 27 фигури, като голяма част от тях за комплексни.

- ✓ Дискусия – състояща се от 10 страници, синтезирана и обобщена информация от получените резултати в дисертационния труд. Дисертантката прави умел опит да анализира механизмът на действие на хемоцианините и на конструираните ваксини и начинът по който различните режими на имунизация влияят върху поведението на тумора и на комуникацията на имунната система с тумора. Използването на толкова големи и комплексни молекули съдържащи различна по състав въглехидратна компонента, както и сложността на имунния отговор, предполага получаването на доста разнообразни и в някои случаи разнопосочни резултати, които докторантката и нейния ръководител научно обосновават и интерпретират. Това разнообразие от данни дава нови възможности за бъдещи разработки с цел задълбочаване в конкретните механизми за по-специфичен контрол върху развитието на тумора.
- ✓ Изводи – 1 страница
- ✓ Използвана литература – 12 страници; 134 използвани източника

4. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

По темата на дисертацията има публикувани две статии в реферираното международно списание Marine Drugs (Q1), с общ IF 10,03. В Scopus се откриват 10 цитирания при изключване на автоцитатите.

По време на дисертацията си, Емилия Стоянова има 7 представяния на национални и международни научни форуми.

Лично участие на докторантката – И в двете представени статии по темата на дисертацията, Емилия Стоянова е първи автор. Също така имам и лични впечатления и наблюдения от работата на Емилия през годините, което ми дава основание да приема безспорно личния принос на дисертантката в извършените изследвания.

5. Критични забележки, препоръки и въпроси

Нямам критични забележки към проведените изследвания. Откриват се някои дребни технически грешки и неточности (напр. заразяване на мишките с клетъчната линия) По-подходящ термин би бил "инокулация". "Заразяване" обикновено се използва в контекста на разпространение на инфекциозни заболявания сред организми.

Тези неточности, по никакъв начин не намаляват качеството на представения дисертационен труд.

От представените резултати и систематизираните изводи се вижда, че освен конструираните ваксини, чистите хемоцианини също имат силен антитуморен ефект.

Би ли могла докторантката, на базата на данните и направените анализи, да определи при какви условия (напр. степен на развитие на тумора, имунен статус на организма или др.) би било по-подходящо да се прилага терапия с чист хемоцианин и кога, терапия с епитоп-специфична ваксина?

6. Автореферат

Авторефератът към дисертационния труд на Емилия Стоянова отразява основните постигнати резултати и отговаря на всички общоприети изисквания в Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България (ППЗРАСРБ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-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 Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИМикБ - БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че Емилия Стоянова **притежава** задълбочени теоретични знания и практически умения като **демонстрира** качества и способности за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Въз основа на изложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, и **предлагам на уважаемото жури да присъди на Емилия Захария Стоянова образователната и научна степен „Доктор“ в направление 4.3. Биологически науки.**

08.01.2025г.

Рецензент:

(доц. д-р Николина Михайлова)