



РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Люба Динева Митева, дб
катедра “Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”
Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора
Вътрешен член на научно жури със Заповед № 4441/11.12.2023 г.
Определена за изготвяне на рецензия с протокол от 15.12.2023 г.

Относно:

Процедура за придобиване на образователно научна степен „Доктор“ в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки“
докторска програма „Молекулярна биология“

Автор на дисертационния труд: Антония Антонова Григорова

Форма на обучение: редовна форма на обучение, заповед № Р-109-260/01.08.2019г

Тема на дисертационния труд: ПРОУЧВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНО-РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ, ВКЛЮЧВАЩИ ПРОМОТОРНИ ПОЛИМОРФИЗМИ НА ЦИТОКИНОВИ ГЕНИ ВЪРХУ ИМУННИЯ ОТГОВОР ПРИ ИМУНО-МЕДИИРАНИ БОЛЕСТИ

Катедра: „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ при Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора

Научен ръководител: Проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн

1. Биографични данни за кандидата:

Антония Антонова Григорова е родена през 1986г в гр. София, където завършва и средното си образование. В периода от 2004-2010г придобива последователно бакалаварска степен по молекулярна биология и магистърска степен по медицинска химия от Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ гр. София. От 2010г. започва работа към лаборатория по Медицинска генетика, Медицински факултет, Тракийски университет на длъжност биолог-специалист. От 01.04.2017г. е зачислена в редовна на обучение по докторантска програма „Молекулярна биология“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки“ Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“ катедра “Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика” на Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора и след изпълнение на индивидуалния учебен план на обучението си е отчислена с право на защита. От 2022г. е назначена на академична длъжност „асистент“ към същата катедра.

2. Структура, актуалност и съдържание на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е в обем от 174 страници. Той е структуриран по стандартен начин и включва: Литературният обзор (40 стр.), Цел и задачи (1стр.), Материали и методи (20 стр.), Резултати (39 стр.); Обсъждане (22 стр.) Изводи, Приноси и библиография. Литературният обзор е онагледен с 5 фигури. Разделите материали и методи и резултатите са богато онагледени с общо 30 таблици и

19 фигури, отличаващи се с прецизност и информативност. В дисертационен труд са цитирани 331 научни източника, голяма част от които са публикувани пред последните 5 години.

Качества на дисертационния труд

Дисертационния труд е посветен на анализ на еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs) в цитокинови гени и техните рецептори, като потенциални фактори повлияващи нивата на кодирания от тях цитокин и предразположението, хода и прогресията на имуномедиирани заболявания при човек – пристъпно-ремитентна множествена склероза (RRMS) и колоректален карцином (CRC). Две заболявания при човек, чиято имунопатогенеза включва дисрегулация на цитокиновия синтез и са обект на имуномодифициращи терапевтични подходи. Въпреки натрупаните познания върху имунопатогенезата на RRMS и CRC, остават редица не ясни моменти, включително дали този дисбаланс е причина за или следствие от заболяванията, доколко генетичните фактори са съществени за неговото развитие. От тази гледна точка, **темата на дисертационен труд е безспорно актуална** с потенциал да изясни дискретни молекулни механизми на имунопатогенезата им.

Литературен обзор

Литературният обзор показва богатата информираност на докторантката по проблематиката, както и способността ѝ да анализира и обобщава научна информация. Структуриран е в общо 5 основни глави, имащи пряко отношение към темата на дисертацията а именно:

- I. Видове цитокини и включваните от тях сигнални пътища като регулатори на имунния отговор
- II. Генетични полиморфизми
- III. Имуно-медиирани заболявания
- IV. Трансформиращ растежен фактор бета (TGF- β) цитокиново семейство
- V. Интерлевкин 18 (IL-18)

Разгледани са видовете цитокини, включена е съвременна класификация на цитокините според различни критерии, като структура, биологичен ефект и т.н. Обърнато е специално внимание на TGF- β и IL-18 и тяхното участие в имунопатогенезата на имуномедиирани заболявания, с акцент върху пристъпно-ремитентна множествена склероза (RRMS) и колоректален карцином (CRC). Представена е генната организация на човешки гени, кодиращи TGF- β 1, TGF- β рецептор II и IL-18 и е обърнато специално внимание на промоторните еднонуклеотидни полиморфизми -607C/A на *IL18*; -509C/T на *TGFB1* и -875G/A на *TGFBR2*.

Задълбоченият анализ на литературните данни дава възможност на Антония Антонова Григорова да формулира ясно и аргументирано поставената **цел на настоящия дисертационен труд**, а именно *Проучване ефекта на промоторни полиморфизми в TGFB1, неговият рецептор TGFBR2 и IL-18 върху серумните цитокинови концентрации и генетичното предразположение към имуномедиирани заболявания.*

За постигането на тази цел Антония Антонова Григорова си поставя **5 конкретни задачи**, които очертават основните стъпки за реализиране на научно-експерименталната дейност.

Материали и методи

За целите на проучването са изследвани 2 основни групи пациенти – 182 пациента с RRMS и 184 пациента с CRC, които са сравнени с контролна група от 307 здрави лица със същата етническа принадлежност. Използван е богат набор от PCR базирани молекулярно-биологични анализа генотипизиране по 3 промоторни SNPs, а именно -607C/A в *IL18* гена; -509C/T в *TGFB1* и -875G/A в *TGFBR2*. Използвани са различни подходи за изолиране на геномна ДНК, както и методи за генотипизиране

вкл. PCR – RFLP включващ амплификация на фрагмент, съдържащ полиморфното място, с последваща рестриктазна реакция. PIRA-PCR- праймер въведен рестрикционен анализ (primer-introduced restriction analysis); алел-специфичен PCR, последвани от електрофоретично разделяне на фрагменти/ампликони и отчитане резултата. Количественото определяне на серумни цитокинови нива е осъществено чрез ензим свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Приложени са подходящи статистически методи за анализ на получените данни..

Използваните методи са напълно адекватни за решаване на поставените задачи и са описани детайлно и точно в проекта на дисертационен труд, което оценявам много високо.

Резултати

Раздел Резултати предствен ясно и е богато илюстриран с таблици и фигури. Представени са голям обем от резултати от проведената експериментална дейност, систематизирани в 2 основни направления:

- асоциативни проучвания за определяне ефекта на изследваните полиморфизми върху генетичното предразположение, тежестта и изхода от съответното заболяване;
- изследване на функционално значение на промоторните полиморфизми на цитокиновите гени върху белтъчния продукт на гена

Изключително богато е първото направление, в което се изследва както индивидуалният ефект на всеки един от изследваните полиморфизми, така и комбинираният ефект от двата функционално свързани полиморфизми в TGFB1 - 509C/T (*rs1800469*) и TGFB2 -875G/A (*rs3087465*) при пациенти с мултиплена склероза. Анализирани са асоциациите между носителството на даден генотип/алел или комбинация от генотипи както за предразположението към RRMS и CRC, така и с начало на клиничната проява или тежестта на болестта, в зависимост от пола на изследваните лица имайки предвид добре известната различната честота сред мъжете и жените на анализирани заболявания. Подход, който е безспорно резонен и който се следва в проучванията и във второто направление за функционалното значение на промоторните полиморфизми за белтъчния продукт, кодиран от съответните гени. Напълно обосновано е обърнато внимание и потенциалният ефект на прилаганата болест-модифициращата терапия върху серумните нива на изследваните цитокини при мултиплена склероза.

Много добро впечатление направи структурирането и форматирането на текста, използвани за подчертаване на някои от по-значимите резултати, с което от една страна се подпомага читателя, а от друга, насочва към ключовите моменти които в последствие са опорните точки в следващия раздел – Обсъждане.

Обсъждане

Представените експериментални данни са умело интерпретирани в раздел Обсъждане. Тук наред със своята литературна осведоменост, Антония Антонова Григорова демонстрира и уменията си да анализира и интерпретира комплексни експериментални данни. В този раздел, получените собствените резултати са съпоставени с тези от други научни колективи като е потърсено логично обяснение за някои налични противоречия.

От анализът на получените резултати, докторантът е извел общо 7 извода и 6 приноса, 4 от които са с оригинален характер и 2 спотвърдителен характер, които приемам напълно

3. Публикации по темата:

Резултатите от изследванията по темата на дисертацията са публикувани в 3 оригинални пълнотекстови научни статии, публикувани в реферирани в издания

ранкирани в Q2 и Q3 **равняващи се на 50**т съгласно действащата нормативна база, с които докторанта преизпълнява формалните нормативни изисквания за придобиване на ОНС „доктор“. Публикуваните научни сатии са намерили своя отзувк в научните среди и са цитирани няколко пъти от чуждестранни автори, което отново доказва високото качество на научно-изследователската дейност по настоящия дисертационен труд.

В допълнение, в периода на обучението си, Антония Григорова е съавтор в други научни публикации извън темата на дисертационния труд, реализирани са и участия в научни форуми и в научни проекти.

Авторефератът отразява обективно дисертационния труд и отговаря на общоприетите изисквания.

4. Критични бележки, препоръки и въпроси:

Към дисертационния труд нямам забележки по същество. Всички мои забележки предложени по време на проведения разширен катедрен съвет са взети под внимание.

5. Заключение

Дисертационният труд от Антония Антонова Григорова е съставен съгласно изискванията за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“. От извършената експериментална работа са постигнати оригинални научни резултати със значим научен принос. Дисертационният труд представя докторанта като изследовател, със солидни познания в областта на молекулярната имунология, който може самостоятелно да организира и провежда научно-екпериментална дейност, да анализира и интерпретира научна информация.

Оценявам положително настоящия дисертационен труд и считам, че отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на Тракийски университет- Стара Загора за неговото приложение.

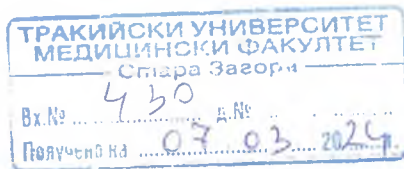
Всичко това ми дава основание, напълно убедено да гласувам положително и препоръчвам на членовете на научното жури да присъди на Антония Антонова Григорова образователната и научна степен „Доктор“ в област 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки научна специалност „Молекулярна биология“.

7.03.2024

гр. Стара Загора

...

Доц. Люба Митева, дб



Ph.D. Thesis Review

From: assoc. prof Lyuba Dineva Miteva, PhD

Department of Molecular biology, Immunology and medical genetics

Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

A member of the Scientific Jury defined by Order No. 4441 /11.12.2023 of the Rector of the Trakia University, Stara Zagora

Appointed to give a review on PhD thesis (protocol No1/15.12.2023)

About a PhD thesis in Professional area 4.3. "Biological Sciences"

Higher Education Area 4. "Natural Sciences, Mathematics and Computer Science"

PhD program in Molecular biology

Author of PhD thesis: Antonia Antonova Grigorova

Title of PhD thesis: "Study of genetic-regulatory mechanisms involving promoter polymorphisms of cytokine genes on the immune response in immune-mediated diseases."

Department: Medical chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

Scientific Supervisor: Prof Spaska Stanilova, PhD, DSc

1. Author's personal data:

Antonia Antonova Grigorova was born in 1986 in Sofia city, where she completed her secondary education. In the period from 2004-2010, she successively obtained a bachelor's degree in molecular biology and a master's degree in medicinal chemistry from Sofia University "St. Kliment Ohridski", Sofia. In 2010 she was appointed as a specialist biologist at the Laboratory of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Trakia University. Since April 1, 2017, Antonia Antonova Grigorova has been enrolled in full-time study in the PhD program of Molecular Biology, field of higher education: 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional trend: 4.3. Biological Sciences, at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics" of the Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora. After implementation of the individual study plan, she has been assigned with the right of defense. From 2022 Antonia Antonova Grigorova has been appointed to the academic position of "assistant" in the same Department.

2. Organization of the PhD thesis and General comments:

The PhD thesis by Antonia Antonova Grigorova is presented in a total volume of 174 pages. The PhD thesis is organized according to the requirements: Literature review (40 pages), Material and methods (20 pages), Results (39 pages), Discussion (22 pages), Conclusions, Contributions and References. The Literature review includes 5 figures. The section Materials and Methods and Results are outlined with 19 figures and 30 tables,

distinguished by precision and informativeness. Total of 331 references were included, most of which from the last 5 years.

Characteristic of the PhD thesis:

The subject of PhD thesis is focused on the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes and their receptors, as potential factors influencing the cytokine levels and the predisposition, and progression of immune-mediated diseases including relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and colorectal cancer (CRC). The immunopathogenesis of both conditions involves cytokine dysregulation and are subject to immunomodifying therapy. Despite the accumulated knowledge on the immunopathogenesis of RRMS and CRC, several underlying mechanisms remain unclear. It is still a subject of debate whether the cytokines imbalance is a cause or consequence of the diseases, and what is the role of genetic factors for their development. Respectively, the topic of the PhD thesis is undeniably current with the potential to elucidate discrete molecular mechanisms of immunopathogenesis.

Literature review:

The literature review shows the rich awareness of the PhD student on the issue, as well as her ability to analyze and summarize scientific information. It is structured in a total of 5 main chapters, directly related to the topic of the dissertation, namely:

- I. Types of cytokines and involved signaling pathways as regulators of the immune response
- II. Genetic polymorphisms
- III. Immune-mediated diseases
- IV. Transforming growth factor beta (TGF- β) cytokine family
- V. Interleukin 18 (IL-18)

The types of cytokines are reviewed, including the most current classification of cytokines according to various criteria, such as structure, biological effect, etc. Special attention is paid to TGF- β and IL-18 as well as their role in the immunopathogenesis of immune-mediated diseases, with emphasis on relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and colorectal carcinoma (CRC). The gene organization of human genes encoding TGF- β , TGF- β receptor II and IL-18 are presented, with particular attention to the promoter single nucleotide polymorphisms -607C/A of the IL18; -509C/T of the TGFB1 and -875G/A of the TGFBR2.

The in-depth analysis of the literature review allows Antonia Antonova Grigorova to formulate the clearly stated aim of this PhD thesis, namely: *Studying the effect of promoter polymorphisms in TGFB1, its receptor TGFBR2 and IL-18 on serum cytokine concentrations and genetic predisposition to immune-mediated diseases.*

To achieve this goal Antonia Antonova Grigorova outlined **5 specific objectives**, outlining the main steps for the realization of the research activity.

Material and Methods:

The study includes 2 main groups of patients - 182 patients with RRMS and 184 patients with CRC. A control group of 307 healthy individuals of the same ethnicities was used for associative analysis. A wide range of PCR-based molecular biological assays were used. Genotyping of 3 promoter SNPs, -607C/A of the *IL18* gene; -509C/T of the *TGFB1* and -875G/A of the *TGFBR2* was performed. Various methods have been used for DNA isolation and genotyping incl. restriction fragment length polymorphism-PCR (RFLP); primer-introduced restriction analysis (PIRA- PCR); amplification refractory mutant system – PCR (ARMS-PCR) followed by electrophoretic separation of fragments/amplicons and reporting of the result. Quantification of serum cytokine levels was determined by enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA). Appropriate statistical methods were applied to analyze the data obtained.

The methods used are adequate in regards to the aim and objectives of the PhD thesis. The Materials and Methods section is highly descriptive allowing to be reproduced by independent researchers.

Results:

The section Results is presented clearly and is illustrated with tables and figures. There are 2 main directions of the obtained results:

- associative studies for the determination the effect of the studied polymorphisms on the genetic predisposition, severity and outcome of the studied diseases;
- study of functional significance of promoter polymorphisms of cytokine genes on the protein product of the gene

The first direction explores the individual effect of each of studied polymorphisms as well as the combined effect of the two functionally related polymorphisms in *TGFBI* - 509C/T (rs1800469) and *TGFBR2* -875G/A (rs3087465) in patients with RRMS. In addition, bearing in mind the well-known different frequency among men and women of RRMS and CRC, sex-stratified analysis was done. Associations between the carrier of a given genotype/allele or combination of genotypes for both RRMS and CRC susceptibility, onset of clinical manifestation or disease severity were analyzed. An approach that is reasonable and that is followed in the second direction of the study on the functional significance of the polymorphisms on the encoded protein product. The potential effect of the applied disease-modifying therapy on the serum levels of the studied cytokines in multiple sclerosis was also explored.

The text structure and formatting highlight some of the more significant results, which on the one hand helps the reader and on the other hand shows the key points which are subject for discussion.

Discussion:

The presented experimental data are adequately interpreted in the Discussion section. Here, alongside her literary awareness, Antonia Antonova Grigorova demonstrates her ability to analyze and interpret complex experimental data. In this section, the obtained results are compared with those of other scientific groups, and a logical explanation is sought for some existing contradictions.

On the basis of the logical analysis of the obtained results, 7 conclusions have been summarized. In addition, the PhD student drew 6 scientific-theoretical contributions to her thesis - 4 original and 2 confirmatory, which I accept fully.

3. Publications:

The results of PhD thesis were presented in 3 full-length scientific papers published in journals with impact factor, ranked in Q2 and Q, equal to **50 points** according to the Law for development of the academic staff in the Republic of Bulgaria, the Statute-book for its application as well as the specific requirements within the corresponding Statute-book of the Trakia University. Respectively, Antonia Antonova Grigorova fulfills the formal regulatory requirements for obtaining the PhD degree. The published scientific papers have found their appreciation in the scientific environment and have been cited several times by other author, which once again shows the high quality of the research work on this work.

In addition, Antonia Antonova Grigorova is a co-author of other scientific paper out of the topic of the PhD thesis, participates in scientific conferences and in research projects.

The abstract of the PhD thesis is designed according to the requirements and reflects the main results, discussion, conclusions and scientific contributions of the PhD thesis.

4. Critical notes, recommendations and questions

I have no critical notes to the PhD thesis. All my remarks proposed during the extended council of the Department have been taken into account.

5. Conclusion

Antonia Grigorova's PhD thesis certainly meets the requirements for obtaining the PhD degree. PhD thesis presents original scientific results with a significant scientific contribution were achieved. The PhD thesis presents Antonia Grigorova as a researcher with solid knowledge in the field of molecular immunology, with high-quality ability to perform research, to analyze and interpret scientific results.

I positively appraise this PhD thesis and think that it fully complies with the requirements of the Law for development of the academic staff in the Republic of Bulgaria, the Statute-book for its application as well as the specific requirements within the corresponding Statute-book of the Trakia University.

All of this gives me a reason to vote positively and I recommend the members of the scientific jury to award Antonia Antonova Grigorova a PhD degree in Professional area 4.3. Biological Sciences, Higher Education Area 4. Natural Sciences, Mathematics and Computer Science, specialty in Molecular biology.

Stara Zagora
7.03.2024

.....
assoc. prof. Lyuba Miteva, PhD