



СТАНОВИЩЕ

от Проф. Милена Атанасова Атанасова, д.б.

Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, МУ - Плевен

Външен член на Научно жури, определено със

заповед 4441 от 11.12.2023 г. на Ректора на ТрУ-Стара Загора

Относно: Дисертационен труд на Антония Антонова Григорова, редовен докторант към Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”, Тракийски университет, Медицински факултет, на тема: „Проучване на генетично-регулаторни механизми, включващи промоторни полиморфизми на цитокинови гени върху имунния отговор при имуно-медицирани болести” с научен ръководител проф. д-р Спаска Станилова, д.б.н., за придобиване на образователна и научна степен „доктор” по научната специалност „Молекулярна биология” в професионално направление 4.3, „Биологически науки”

Представените от докторантката А. Григорова документи отговарят на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Тракийски университет, Медицински факултет, Стара Загора.

Професионално развитие

Антония Антонова Григорова е завършила Софийски университет „Св. Климент Охридски”, придобивайки бакалавърска степен по специалност „Молекулярна биология” през 2008 г. и магистърска степен по специалност „Медицинска химия”, през 2010 г. От 2010 г. работи като биолог-специалист в секция „Медицинска генетика” на катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”, а от 2022 г. е асистент в секция „Молекулярна биология” към същата катедра. Владее писмено и говоримо английски език, работи със съвременните софтуерни продукти за статистическа обработка на данни и научни публикации.

Със Заповед № 769 / 04.04.2017 г. на Ректора на ТрУ е зачислена като редовен докторант в Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика”, за придобиване на образователна и научна степен „доктор”. Отчислена е с право на защита с заповед № 1019 / 10.05.2021 г. и протокол №4/27.04.2021 г. от ФС на МФ.

Актуалност на дисертационния труд

Дисертационният труд изследва функционалния ефект на единични нуклеотидни полиморфизми в гените на два цитокина (TGF β и IL18) и техните рецептори върху серумните нива на изследваните цитокини, както и тяхната асоциация към генетичната предразположеност при множествена склероза и колоректален карцином. Поставените цели и задачи отговарят на необходимостта от биомаркери за прогнозиране на началото и развитието на тези заболявания, както и повлияването им от прилаганото лечение.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 173 стандартни страници и е богато онагледен с 30 таблици и 19 фигури. Библиографската справка включва 331 литературни източници на английски език, по-голяма част от които от последните 10 години.

Литературният обзор е написан компетентно и задълбочено. Прави впечатление широкото ползване и познаване на световната литература по проблема. Направен е преглед на известните данни за синтеза и ефектите на цитокините и техните рецептори, участието им в сигналните пътища, стоящи в основата на медиацията на имунния отговор в норма и патология. Представени са познатите еднонуклеотидни вариации на гените в промотора и връзката на тези полиморфизми с имуномедираните патологии.

В собствените проучвания са посочени **целта, задачите, материалите и методите** на изследване. Целта е ясно и точно формулирана – да се установи ефектът на определени промоторни полиморфизми в TGF β 1, неговият рецептор TGF β 2 и IL-18 върху серумните цитокинови концентрации и генетичното предразположение към имуномедираните заболявания. За нейното постигане са набелязани 5 задачи.

Изследвани са две групи пациенти, с пристъпно-ремитентна множествена склероза (ПРМС) и с колоректален карцином (КРК). Обектите на изследването са подбрани по строго установени критерии на включване и изключване. Демографските и клиничните характеристики на пациентите са представени в таблици.

За постигане целите на разработката са приложени съвременни методи - полимеразна верижна реакция с най-актуалните му разновидности: PCR с последваща рестриктазна реакция по дължината на полиморфизма (RFLP); праймер-въведен рестрикционен анализ (PIRA-PCR-primer-introduced restriction analysis); алел специфичен PCR или PCR, използващ мутационна система, рефлектираща върху амплификацията (amplification refractory mutation system - ARMS-PCR). За изследване на серумните нива на цитокините са използвани търговски китове, базирани на принципа на ELISA. Приложени са подходящи статистически анализи за установяване на статистически значими разлики и зависимости.

Дисертационният труд е изграден върху обширен експериментален материал и съдържа оригинални **резултати**. Илюстриран е богато с 19 графики и 22 таблици. Изследвани са някои еднонуклеотидни полиморфизми в гените TGFB1 и TGFBR2; IL18 при пациенти с ПРМС и КРК, генотипната и алелната им честота, влиянието им върху нивата на цитокините в серума, асоциацията им с началото и стадия на заболяването, както и с отговора към прилаганото лечение.

В **Дискусията** продължава теоретичното обобщение започнато в обзора, като се сравняват и анализират получените резултати с тези, описани в световните бази данни. В заключение са формулирани **7 извода**: За пръв път е установена връзка между определен генотип за TGF- β и един от рецепторите му с предразположение към ПРМС, която зависи от пола (установена е само при мъже). Някои от изследваните специфични единични полиморфизми имат значение за началото на заболяването, както и за отговора към приложеното лечение. Показани са значими разлики в серумното ниво на TGF- β 1 и IL-18 при пациенти с ПРМС в зависимост от техния пол и терапия, които биха могли да се използват като биомаркери за по-прецизни терапевтични стратегии. Доказана е връзката на определени генотипове за TGFBR2 с намален риск от КРК.

Формулирани са **4 приноси** с оригинален характер и **2** с потвърдителен характер, които аз напълно приемам.

Оригинален принос на дисертационния труд са доказаните полово-специфични разлики относно ефекта на изследваните полиморфизми при пациенти с ПРМС и КРК. Установен е синергичен ефект на два от изследваните алели за TGFB1 и TGFBR2, които са протективни по отношение на развитието на ПРМС при мъже. Установена е значимата роля на комбинацията от TGFB1 -509C/C генотип и TGFBR2 -875G/A + TGFBR2 -875A/A генотип, като рискови фактори за проява на ПРМС под 30 годишна възраст при жени. Установена е протективна роля на хетерозиготното носителство по TGFBR2 -875GA полиморфизма в предразположеността към КРК при мъже.

Потвърдени са данните за участието на TGF- β 1 и IL-18 в имунопатогенетичните механизми на ПРМС и повлияването им от провежданата терапия. Потвърден е функционалният ефект на изследваните полиморфизми в промоторните области на TGFB1 и IL18 гените.

Автореферат и публикации, свързани с темата на дисертационния труд

Авторефератът към дисертационния труд отразява правилно структурата му и съдържа най-важните резултати и изводи от проучването. Във връзка с темата на дисертационния труд Антония Антонова Григорова представя 3 научни публикации, реферирани и индексирани в световни бази данни с импакт-фактор, както и 3 участия в научни форуми в България. Една от публикациите има две отбелязани цитирания. Антония Григорова има участие и в 3 проекта, които са свързани с тематиката на дисертационния ѝ труд.

Критики и въпроси

Предложеният ми за становище дисертационен труд се базира на систематична работа по събиране и анализ на данни и познаване и опит при работа с молекулярно биологични методи. Забележките които ще си позволя, касаят необходимостта от още малко усилия при оформлението на труда в стилистично и граматично отношение, включително и при превода на някои научни термини на български език, дублиране на съкращения и пр. Литературният обзор би бил по лесен за възприемане, ако се обобщят подробности при описанията на каскадните сигнални пътища. Това в никакъв случай не намалява научната стойност и принос на този много съдържателен дисертационен труд.

Заклучение

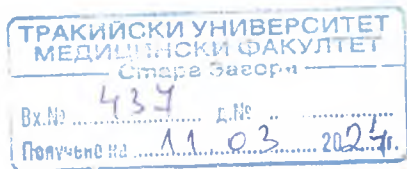
В заключение, считам, че дисертационният труд на Антония Антонова Григорова за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по актуалност, обем на проучването, методология, изводи, конкретни научни и приложни приноси отговаря напълно на критериите на Закона за развитие на академичния състав в Р България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Тракийски университет - Стара Загора.

Във връзка с всичко гореизложено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Научното жури да присъдят на Антония Антонова Григорова образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Молекулярна биология“.

11.03.2024 г.

Проф. Милена Атанасова, д.б.





REVIEW

By prof. Milena Atanasova Atanasova, PhD

Department of Anatomy, Hystology, Cytology, and Biology, MU - Pleven

External member of the Scientific Jury,

appointed by Order 4441 от 11.12.2023 г. of the Rector of Trakia University –
Stara Zagora

Regarding: Dissertation of Antonia Antonova Grigorova, full-time PhD student at the Department of „Molecular biology, Immunology and Medical genetics”, Trakia University, Faculty of Medicine, on the topic: „Study of genetic regulatory mechanisms involving promoter polymorphisms of cytokine genes on the immune response in immune-mediated diseases“ with scientific supervisor prof. Spaska Stanilova, PhD, MSc, for attaining the educational and scientific degree of Doctor in the scientific specialty of Molecular Biology the professional field of Biological Sciences.

The documents submitted by the PhD students comply with the Law for the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for the Conditions and Procedure for Acquisition of Scientific Degrees and Occupation of Academic Positions at Trakia University, Faculty of Medicine, Stara Zagora.

Professional Development

A. Grigorova graduated from Sofia University "St. Kliment Ohridski", obtaining a Bachelor's degree in Molecular Biology in 2008 and a Master's degree in Medicinal Chemistry in 2010. Since 2010 she has been working as a biologist in the Medical Genetics Section of the Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, and since 2022 she becomes an assistant- professor in the Molecular Biology Section of the same Department. She is fluent in written and spoken English, works with modern statistical data analysis software and scientific publications.

By Order No. 769 / 04.04.2017 of the Rector of Trakia University she was enrolled as a full-time PhD student in the Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, for the acquisition of the educational and scientific degree Doctor. She was dismissed with the right to defend by order No. 1019 / 10.05.2021 and protocol No. 4/27.04.2021 of the Faculty of Medicine Council.

Relevance of the thesis

This dissertation investigates the functional effects of single nucleotide polymorphisms in the genes of two cytokines (TGF β and IL18) and their receptors on the serum levels of the studied cytokines, as well as their association with genetic susceptibility in multiple sclerosis and colorectal cancer (CRC). The aims and objectives meet the need of biomarkers for prediction the onset and progression of these diseases, as well as their impact on the applied treatment.

Structure of the dissertation

The dissertation is written in 173 standard pages and is richly illustrated with 30 tables and 19 figures. The bibliography includes 331 references in English language, most of them from the last 10 years.

The literature review is competently and thoroughly written. The extensive use and knowledge of the world literature on the issue is impressive. A review is made of the known data on the synthesis and effects of cytokines and their receptors, their involvement in the signalling pathways underlying the mediation of the immune response in health and disease. The known single nucleotide variations of promoter genes and the relationship of these polymorphisms to immune-mediated pathologies are presented.

In the own studies, the **aim, objectives, materials and methods of research** are specified. The aim is clearly and precisely stated - to determine the effect of certain promoter polymorphisms in TGF β 1, its receptor TGF β 2 and IL-18 on serum cytokine concentrations and genetic predisposition to immune-mediated diseases. To achieve it, 5 objectives were formulated.

Two groups of patients were studied, those with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and those with CRC. The study subjects were selected according to strict inclusion and exclusion criteria. The demographic and clinical characteristics of the patients are presented in tables.

To achieve the objectives of the study, modern methods were applied: polymerase chain reaction with its most recent variants: PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP); primer-introduced restriction analysis (PIRA-PCR); allele-specific PCR or PCR using amplification refractory mutation system (ARMS-PCR). Commercial ELISA-based kits have been used to examine serum cytokine levels. Appropriate statistical analyses were applied to detect statistically significant differences and correlations.

The dissertation is built on extensive experimental material and contains **original results**. It is richly illustrated with 19 graphs and 22 tables. Some single nucleotide polymorphisms in the TGF β 1 and TGF β 2; IL18 genes in patients with RRMS and CRC, their genotypic and allelic frequencies, their influence on serum cytokine levels, their association with disease onset and stage, as well as with the response to the treatment administered are investigated.

The **Discussion** continues the theoretical synthesis started in the review by comparing and analysing the results obtained with those described in the world databases, and at the end 7 conclusions are drawn: For the first time, an association between a specific genotype for TGF- β and one of its receptors with predisposition to RRMS has been found to be sex-dependent (it was found only in men). Some of the specific single polymorphisms investigated have relevance for disease onset as well as response to treatment. Significant differences in serum TGF- β 1 and IL-18 levels have been shown in patients with RRMS depending on their sex and therapy, which could be used as biomarkers for more precise therapeutic strategies. The association of certain genotypes for TGFBR2 with reduced risk of CRC has been demonstrated.

The contributions are divided into 4 original and 2 confirmatory contributions, which I fully accept.

The original contribution of this dissertation is the demonstrated sex-specific differences in the functional effect of the studied polymorphisms in patients with RRMS and CRC. The synergistic effect of two of the studied alleles for TGFBR1 and TGFBR2 was found to be protective with respect to the development of RRMS in males. The significant role of the combination of TGFBR1 -509C/C genotype and TGFBR2 -875G/A + TGFBR2 -875A/A genotype as risk factors for the occurrence of RRMS under the age of 30 years in women was found. A protective role of heterozygous TGFBR2 -875GA polymorphism carriage in the susceptibility to CRC in men was found.

The data on the involvement of TGF- β 1 and IL-18 in the immunopathogenetic mechanisms of CRC and their influence on ongoing therapy were confirmed. The functional effect of the studied polymorphisms in the promoter regions of TGFBR1 and IL18 genes was confirmed.

Abstract and publications related to the dissertation topic

The abstract to the dissertation reflects its structure correctly and contains the most important results and conclusions of the study. In relation to the topic of the dissertation A. Grigorova presents 3 scientific publications, refereed and indexed in world databases with impact factor, as well as 3 participations in scientific forums in Bulgaria. One of the publications has two citations. A. Grigorova has also participated in 3 projects, which are related to the topic of her thesis.

Criticism and questions

The dissertation is based on systematic work in data collection and analysis and knowledge and experience in working with molecular biological methods. There are some remarks concerning the need for some more effort in the layout of the work in terms of style and grammar, including the translation of some scientific terms into English, duplication of abbreviations, etc. The literature review would be easier to comprehend if the details in the

descriptions of cascade signalling pathways were summarized. This in no way diminishes the scientific value and contribution of this very informative dissertation.

Conclusion

In conclusion, I believe that the dissertation of Antonia Antonova Grigorova for the PhD degree in terms of relevance, scope of the study, methodology, conclusions, specific scientific and applied contributions fully meets the criteria of the Law for the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for the Conditions and Procedure for the Acquisition of Scientific Degrees and Academic Positions at Trakia University – Stara Zagora.

Regarding all of the above, I give my positive evaluation and recommend the members of the Scientific Jury to award to Antonia Antonova Grigorova the educational and scientific degree Doctor in the scientific specialty Molecular Biology.

11.03.2024 г.

Prof. Milena Atanasova, PhD.

