



## СТАНОВИЩЕ

**от д-р Виктория Сарафян - Озаян, дм, дмн,**  
професор по имунология в Медицински университет – Пловдив,  
специалист по клинична имунология и по медицинска биология,  
ръководител на Катедра „Медицинска биология“  
на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен  
“доктор”

Професионално направление - *Биологически науки*  
Докторска програма - *Молекулярна биология*

**Автор: Антония Антонова Григорова,** докторант в Катедра „ Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“, Медицински факултет на Тракийски университет – Ст. Загора

**Тема: “Проучване на генетично-регулаторни механизми, включващи промоторни полиморфизми на цитокинови гени върху имунния отговор при имуно-медирирани болести“**

**Научен ръководител:** проф. Спаска Станилова, дбн

### Общи данни

Рецензията е изготвена в изпълнение на Заповед № 4441/ 11.12.2023 г. на ректора на Тракийски университет – Ст. Загора, въз основа на представен на хартиен и електронен носител дисертационен труд в обем от 132 страници и 38 страници книтопис. Основното впечатление от дисертацията е за дългогодишно и внимателно планирано научно проучване, в което със съвременна методология се изследват различни патологии, продължавайки научната тематика на катедрата върху цитокиновите полиморфизми, въведена от проф. Станилова. В хода на разработката докторантката е обогатила своята подготовка в областта на съвременната имунология и молекулярна биология.

Дисертацията е структурирана по правилата за изготвяне на дисертационен труд. В настоящия ѝ вид отделните раздели са представени, както следва: въведение – 2 стр.; литературен обзор – 39 стр.; цел и задачи – 1 стр.; материал и методи – 19 стр.; резултати – 37 стр.; дискусия и заключение – 20 стр.; изводи –

1 стр.; приноси – 1 стр. и цитирани 331 литературни източници на 38 стр. Работата е илюстрирана с 19 фигури и 30 таблици.

### **Актуалност на тематиката**

Високата честотата на имуно-медианите процеси и комплексната патогенеза на невродегенеративните и онкологични заболявания, чиито интимни механизми са все още ненапълно изяснени, определят темата на дисертационния труд като навременна и актуална.

Въпреки очевидният напредък на съвременната молекулярна биология и имунология, все още има много неясни въпроси, свързани с ключови молекули и пътища, участващи в регулацията на имунния отговор.

Настоящата дисертация е продължение на дългогодишните търсения на ръководения от проф. Станилова екип за изясняване ролята на цитокиновите полиморфизми в различни патологични процеси. Този път усилията са насочени към пристъпно-ремитентната мултиплена склероза и колоректалния карцином – на пръв поглед много различни по етиология и патогенеза заболявания, но обединени чрез нарушенията в имунния отговор и сигнализация. Свързващото звено в тези две патологии са цитокините TGF- $\beta$ 1 и IL-18, техните рецепторни полиморфизми и сигналната трансдукция, в която участват. Изборът на тези прицелни молекули е добре аргументиран с оглед на ролята на TGF- $\beta$ 1 като антиинфламаторен и регулаторен цитокин. IL-18 като проинфламаторен медиатор модулира вродения и придобития имунитет и участва в патогенезата на автоимунни или хронични възпалителни заболявания. Несъмнено резултатите от този фундаментален по своя характер труд имат и клинични перспективи и са пример за транслационна наука.

### **Познаване на проблема**

В литературния преглед личи отлично познаване на проблема и творчески анализ на цитираната литература. Разгледани са видовете цитокини и сигналните пътища, регулиращи на имунния отговор. Представени са генетичните полиморфизми и патогенезата на имуно-медианите заболявания. Обърнато е внимание на TGF- $\beta$  цитокиновото семейство, като е акцентирано върху продукцията, биологичните ефекти, рецепторите и сигналната трансдукция.

Разгледани са гените за TGF- $\beta$  и TGFBR2 и полиморфизмите в промоторния регион на двата гена, както и актуални проучвания за връзката на *TGFB1* и *TGFBR2* полиморфизмите и предразположението и тежестта към пристъпно-ремитентната мултиплена склероза и колоректалния карцином. По подобен начин са представени и литературните данни за IL-18.

Публикациите в наличната научна литература за функционалния ефект на тези SNPs, серумните нива на изследваните цитокини, асоциацията им с генетичната предиспозиция и тежест към имуно-медианите болести са противоречиви, особено за патологиите, обект на дисертацията. Това мотивира разработването на настоящия дисертационен труд.

Наличието на кратко обобщение в края на литературния обзор с изводи за нерешените проблеми би насочило логично към поставената цел на изследването.

**Целта** е ясно дефинирана и напълно съответства на съдържанието на работата.

**Задачите** са формулирани конкретно и отразяват детайлно предстоящата работа.

#### **Материали и методи**

Таргетната група е впечатляваща като численост, с ясно определени критерии за включване - 183 пациенти с пристъпно-ремитентна множествена склероза и 184 хистологично потвърдени пациенти с колоректален карцином. Демографските и клинични данни на пациентите са коректно представени.

Подробно са описани използваните методи: изолиране на ДНК, определяне на количеството на изолираната ДНК, PCR, генотипиране на полиморфизми в гените *TGFB1*, *TGFBR2* и *IL18*, агарозна гел електрофореза на ДНК, изолиране на серум, ELISA и статистически методи.

Предимство на дисертационния труд е съчетанието на информативна методология с оригинална научна идея. Високо информативни и прецизно изпълнени молекулно-биологични техники върху голяма пациентска кохорта е определено силната страна на дисертационния труд на А. Григорова.

В хода на разработване на дисертацията си докторантката е доказала и умението си за екипна работа и е надградила образованието на химик с познания и умения в областта на молекулярната биология и имунология.

#### **Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Резултатите са безспорно оригинални и са представени подробно. Особено оригинални са данните, свързани с пристъпно-ремитентната множествена склероза. Те доказват убедителна връзка между генотипа *TGFBI* -509C/T и *TGFBR2* -875G/A и генетичната предиспозиция към това заболяване. Мъже, носители на поне един *TGFBI* -509T алел, имат по-нисък генетичен риск от развитие на пристъпно-ремитентна множествена склероза, който е още по-нисък, когато генотипът съществува съвместно с *TGFBR2* -875A алела. Тази комбинация на тези генотипи вероятно има защитна роля. Интересна находка е фактът, че комбинацията от *TGFBI* -509C/C и *TGFBR2* -875G/A / *TGFBR2* -875A/A предразполага към по-ранно начало на поява на симптомите. Авторите установяват значителни разлики в серумното ниво на TGF- $\beta$ 1 и IL-18 при пациентите в зависимост от техния пол и терапия. Това е оригинална находка, която поставя въпроса за използването им като потенциални биомаркери.

По отношение на колоректалния карцином, *TGFBR2* -875GA и AA генотиповете се оказват свързани с по-нисък риск. Особено мъжете, носители на A алел, имат по-нисък риск от развитие и прогресия на заболяването.

Резултатите са представени логично и последователно в съответствие с поставените задачи и са отлично онагледени.

Тези реални и оригинални резултати са публикувани в 3 статии в международни реферирани периодични издания.

Изследванията по дисертацията са реализирани с подкрепата на три научноизследователски проекта към Тракийски университет.

**Обсъждането** на комплексните резултати е целенасочено и задълбочено и показва отлично познаване на актуалното състояние на проблема. Макар и относително кратка, дискусията обсъжда критично собствените резултати. Би било добре, ако в заключението към обобщението се трасират и бъдещите насоки в изследванията по проблема.

**Изводите** са информативни и отразяват същността на изследването. Приемам изводите от дисертационния труд като съдържание и като лично дело на докторанта, под компетентното ръководство на научния ѝ ръководител. Те убедително представят резултатите на дисертацията.

**Приносите** приемам напълно и считам, че те са оригинални и достатъчни за подобен дисертационен труд.

**Библиографията** включва 331 литературни източника, които предполагам, че докторантката познава в цялост, а не само като абстракти.

**Авторефератът** е изготвен по стандартния начин и отразява коректно дисертационния труд.

#### **Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

В една от трите статии, свързани с дисертацията, Антония Григорова е първи автор - *Folia Neuropathol* (Q3, IF2020= 2.038). В другите две тя е втори и трети автор - *World Journal of Gastrointestinal Oncology* (Q2, IF2021=3.404) и *Journal of IMAB* (Q3, SJR2020=0.225). Две от публикациите са с импакт фактор.

А. Григорова е представила резултатите от своето проучване на 3 национални форума.

Приемам, че тези публикации отговарят на изискванията на Медицински факултет на Тракийски университет за защита на дисертационен труд за образователна и научна степен „доктор“.

#### **Препоръки и коментари:**

Смятам, че би трябвало да се даде по-голяма гласност пред научната общност за резултатите от това безспорна оригинално проучване, което дисертантката да представи и в бъдеще на специализирани научни форуми.

Какви са идеите за продължаване или разширяване на разработваната тематика? Предвижда ли се анализ на проучените цитокини и техните полиморфизми при друга патология? Хипотеза за таргетна терапия на базата на получените резултати?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на **Антония Антонова Григорова** съдържа научни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и

отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника на Тракийски университет – Ст. Загора за придобиване на образователната и научна степен “доктор”.

Поради гореизложеното, *давам своята положителна оценка* за проведеното изследване и предлагам на членовете на научното жури да присъдят образователната и научна степен “доктор” по молекулярна биология на **Антония Антонова Григорова**.

06. 02. 2024 г.

проф. д-р Виктория Сарафян, дм. дмн 



## STATEMENT OF OPINION

by **Victoria Sarafian, MD, PhD, DMSc,**

Professor of Immunology at the Medical University of Plovdiv,

Specialist in Clinical Immunology and Medical Biology,

Head of the Department of Medical Biology.

Regarding the thesis for the award of the educational and scientific degree "**PhD**"

Professional field – **Biological Sciences**

Doctoral program - **Molecular Biology**

**Author:** Antonia Antonova Grigorova, PhD student

Topic: "**Investigation of genetic-regulatory mechanisms involving promoter polymorphisms of cytokine genes on the immune response in immune-mediated diseases**"

**Research Supervisor:**

Prof. Spaska Stanilova, PhD, DSc

### **General data**

The review is prepared in compliance with the Order No. 4441/ 11.12.2023 of the Rector of the University of Thrace - St. Zagora, on the basis of a dissertation submitted on paper and electronic media in the volume of 132 pages and 38 pages of references. The main impression of the dissertation is of a long and carefully planned scientific study, in which various pathologies are investigated with modern methodology, continuing the scientific topics of the department on cytokine polymorphisms, introduced by prof. Stanilova. In the course of the investigation, the PhD student has enriched her training in the field of modern immunology and molecular biology.

The dissertation is structured according to the rules for the preparation of a PhD thesis. In its present form, the individual sections are presented as follows: introduction - 2 pages; literature review - 39 pages; aim and objectives - 1 page; material and methods - 19 pages; results - 37 pages; discussion and conclusion - 20 pages; conclusions - 1 page; contributions - 1 page and citations of 331 references on 38 pages. The thesis is illustrated with 19 figures and 30 tables.

## **Topical relevance**

The high incidence of immune-mediated processes and the complex pathogenesis of neurodegenerative and oncological diseases, the intimate mechanisms of which are still incompletely understood, define the topic of this dissertation as timely and relevant.

Despite the obvious advances in modern molecular biology and immunology, there are still many unclear questions regarding key molecules and pathways involved in the regulation of the immune response.

This dissertation is a continuation of the long-standing research led by Prof. Stanilova team to clarify the role of cytokine polymorphisms in various pathological processes. This time the efforts are focused on relapsing-remitting multiple sclerosis and colorectal carcinoma - seemingly very different diseases in etiology and pathogenesis, but united by the disturbances in immune response and signaling. The connecting link in these two pathologies are the cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-18, their receptor polymorphisms and the signal transduction in which they are involved. The choice of these target molecules is well justified in view of the role of TGF- $\beta$ 1 as an antiinflammatory and regulatory cytokine. IL-18 as a proinflammatory mediator modulates innate and acquired immunity and is involved in the pathogenesis of autoimmune or chronic inflammatory diseases. Undoubtedly, the results of this seminal work also have clinical perspectives and are an example of translational science.

## **Knowledge of the problem**

**The literature review** demonstrates an excellent knowledge of the problem and a creative analysis of the literature cited. The types of cytokines and signaling pathways regulating the immune response are discussed. Genetic polymorphisms and the pathogenesis of immune-mediated diseases are presented. The TGF- $\beta$  cytokine family is addressed, with emphasis on production, biological effects, receptors, and signal transduction. The genes for TGF- $\beta$  and TGFBR2 and polymorphisms in the promoter region of both genes are discussed, as well as current studies on the



relationship of TGFB1 and TGFBR2 polymorphisms and the predisposition and severity of relapsing-remitting multiple sclerosis and colorectal cancer. Literature data on IL-18 are similarly presented.

Data in the scientific literature on the functional effect of these SNPs, serum levels of the cytokines studied, and their association with genetic predisposition and severity to immune-mediated diseases are conflicting. This motivated the development of this dissertation.

The presence of a brief summary at the end of the literature review with conclusions about the unresolved issues would logically point to the stated aim of the study.

**The aim** is clearly defined and fully consistent with the content of the thesis.

**The tasks** are formulated specifically and reflect in detail the work to be done.

## **Materials and methods**

The target group is impressive in number, with clearly defined inclusion criteria - 183 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis and 184 histologically confirmed colorectal cancer patients. Patient demographics and clinical data are correctly represented.

The methods used are described in detail: DNA isolation, quantification of isolated DNA, PCR, genotyping of polymorphisms in the TGFB1, TGFBR2 and IL18 genes, agarose gel electrophoresis of DNA, serum isolation, ELISA and statistical methods.

The combination of informative methodology with an original scientific idea is an advantage of this dissertation. Highly informative and precisely executed molecular biology techniques on a large patient cohort is definitely the strength of A.'s dissertation. Grigorova.

In the course of developing her dissertation, the PhD student has also demonstrated her teamwork skills and has built on her training as a chemist with knowledge and skills in molecular biology and immunology.

## **Characteristics and evaluation of the thesis and contributions**

The results are unquestionably original and are presented in detail. Particularly original are the data related to relapsing-remitting multiple sclerosis. They demonstrate a convincing association between the TGFB1 -509C/T and TGFBR2 -875G/A genotypes and genetic predisposition to this disease. Men carrying at least one TGFB1 -509T allele have a lower genetic risk of developing relapsing-remitting multiple sclerosis, which is even lower when the genotype coexists with the TGFBR2 -875A allele. This combination of these genotypes likely has a protective role. An interesting finding is that the combination of TGFB1 -509C/C and TGFBR2 -875G/A/TGFBR2 -875A/A predisposes to earlier onset of symptoms. The authors found significant differences in serum TGF- $\beta$ 1 and IL-18 levels in patients depending on their gender and therapy. This is an original finding that raises the question of their use as potential biomarkers.

Regarding colorectal cancer, TGFBR2 -875GA and AA genotypes appeared to be associated with lower risk. Especially men carrying the A allele have a lower risk of disease development and progression.

The results are presented logically and consistently in accordance with the objectives and are well illustrated.

These real and original results have been published in 3 articles in international refereed journals.

The dissertation research was supported by three research projects at Thracian University.

**The discussion** of the complex results is focused and thorough and shows excellent knowledge of the current state of the problem. Although relatively brief, the discussion critically discusses the own results. It would be helpful if the conclusion to the summary also traced future research directions on the problem.

**The conclusions** are informative and reflect the essence of the research. I accept the conclusions of the dissertation as substantive and as the personal work of the doctoral student, under the competent guidance of her supervisor. They convincingly present the results of the dissertation.

I fully accept the contributions and consider them original and sufficient for such a dissertation.

**The bibliography** includes 331 references, which I assume the PhD student knows in their entirety and not only as abstracts.

**The abstract** is prepared in the standard manner and correctly reflects the dissertation.

#### **Assessment of publications and personal contribution of the PhD student**

Antonia Grigorova is first author on one of the three articles related to the dissertation - Folia Neuropathol (Q3, IF2020= 2.038). In the other two she is second and third author - World Journal of Gastrointestinal Oncology (Q2, IF2021=3.404) and Journal of IMAB (Q3, SJR2020=0.225). Two of the publications have an impact factor.

A. Grigorova has presented the results of her study at 3 national forums.

I accept that these publications meet the requirements of the Medical Faculty of the University of Thrace for the defense of a dissertation for the PhD degree.

#### **Recommendations and comments:**

I believe that more publicity should be given to the scientific community for the results of this undoubtedly original study, which the dissertator should present in the future at specialized scientific forums.

What are the ideas for continuing or expanding the topic under development? Are there plans to analyze the studied cytokines and their polymorphisms in other pathology? Hypothesis for target therapy based on the results obtained?

#### **CONCLUSION**

The dissertation work of Antonia Antonova Grigorova contains scientific and applied results, which represent an original contribution to science and meet the requirements of the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations of the University of Thrace - St. Zagora for the acquisition of the educational and scientific degree "PhD".

Because of the above, I give my positive evaluation for the conducted research and I propose the members of the scientific jury to award the educational and scientific degree "PhD" in Molecular Biology to Antonia Antonova Grigorova

06. 02. 2024

**Professor Victoria Sarafian, MD, PhD, DMSc**