



СТАНОВИЩЕ

от професор Диана Георгиева Иванова, доктор на науките,
декан на Факултета по фармация
при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ - град Варна

за дисертационен труд на Елина Александрова Александрова
от катедра Медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при Тракийски
университет-Стара Загора, на тема: „ГЕНЕТИЧНИ И КЛЕТЪЧНИ ФАКТОРИ НА
ИМУННАТА СИСТЕМА ПРИ КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ“, представен за
присъждане на научна и образователна степен „Доктор“ по научна специалност
„Биохимия“

1. Актуалност на дисертационния труд

Колоректалният карцином (КРК) е онкологично заболяване, засягащо повече от 1 милион хора в света към настоящия момент и се нарежда в челните места като причина за смърт от злокачествени заболявания и при двата пола. Точният механизъм на развитието му не е напълно изяснен, но поддържането на хронично възпаление в организма и различни генетични фактори се приемат за предразполагащи в патогенезата на КРК. Ролята на цитокиновия профил, както и съставът на възпалителната микросреда се открояват като водещи фактори в развитието и прогресията на КРК.

Поради високата социална значимост на това заболяване през последните години се наблюдава повишен интерес към проучването на генетичните фактори, въввлечени в предиспозицията към КРК. Установени са множество полиморфизми в гените, кодиращи цитокиновите молекули, голяма част от които са функционални, асоциирани с променена генна експресия, поради което могат да повлияват патогенезата на различни онкологични заболявания, в това число и КРК. Дисрегулацията на цитокиновата продукция повлиява както туморната прогресия, така и противотуморния имунитет, затова такива функционални полиморфизми могат да се разглежат като значими генетични детерминанти за индивидуалната предразположеност и прогноза за изхода от КРК.

В този аспект проучванията в настоящия дисертационен труд са посветени на един актуален научен проблем, какъвто е фундаменталната онкогенетика и допринасят за получаването на нови данни относно приноса на някои генетични и клетъчни фактори на имунната система за изявата на КРК в Българската популация.

2. Структура на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд съдържа 123 страници и е онагледен с 48 фигури и 16 таблици. Цитирани са 276 литературни източника, 4 на кирилица и 272 на латиница. Дисертацията е структурирана в традиционен стил, включваща раздели в подходящи пропорции, а именно: въведение - 2 страници, литературен обзор и изводи - 29 страници, цел и задачи - 2 страници, материали и методи - 9 страници, резултати - 39 страници, обсъждане - 14 страници, изводи - 1 страница, приноси - 1 страница, библиография - 25 страници, благодарности - 1 страница.

3. Литературна и методологична обезпеченост

Литературният обзор съдържа задълбочен и информативен анализ на достъпната научна литература, свързана с ролята на ключовите в противотуморния имунитет цитокини и генетични полиморфизми, асоциирани с предиспозицията към КРК. Информацията е представена последователно в раздели, разглеждащи отделно ролята на цитокините TGF- β 1, IL-10, IL-12, IL-17A и IL-17F, както и ролята на дендритните клетки в молекулярната патогенеза на заболяването. Обзорът показва богатата информираност на докторантката по проблематиката, както и способността ѝ да вниква в същността на разглежданите проблеми и умело да ги обобщава. Илюстриран е с 8 фигури и 1 една таблица, които много успешно подпомагат възприемането на информацията в текста. В края е изведено заключение, което представя неизяснените въпроси в разглежданата проблематика и мотивира необходимостта от провеждането на изследванията на дисертационния труд.

Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани ясно и конкретно, а последователността и решаването на задачите дава възможност за постигане на крайната цел: изясняване ролята на генетични полиморфизми в гени, кодиращи възлови цитокини в имунната регулация, за развитието и прогресията на колоректален карцином в извадка от Българската популация, както и да се проучи зависимостта между установените генотипи и инфилтрацията на туморната тъкан с различни популации дендритни клетки.

Научната разработка е осъществена на базата на биологичен материал от голяма представителна група от 256 пациента с КРК и 292 незасегнати от заболяването контроли.

Представените в дисертационния труд резултати са получени и анализирани при умелото използване на съвременни молекулярно-биологични методи. Материалите и методите са адекватно подбрани, за да се постигнат целите и задачите на проучването. Методите са представени информативно и ясно в раздела „Материали и методи“ с включване на таблица с демографските и клинични показатели на изследваните пациенти. Подробно са представени подходите за генотипиране по отделните полиморфизми (RFLP- или ARMS-PCR техники), използваните при всеки анализ праймери и условията на провежданите реакции. Използването

на имунохистохимична техника и количествен PCR в реално време за определяне относителната генна експресия на гените *TGFBI* и *IL17A* допълват богатия набор от молекулярно-биологични анализи, което е високо постижение на дисертанта.

Данните от всички експерименти са подходящо обработени статистически с прилагането на софтуерния пакет SPSS v.25 и посредством компетентното прилагане на съответните статистически методи - дескриптивен анализ, анализ на съответствията (закон на Харди-Вайнберг), логистичен регресионен анализ и др.

4. Резултати и обсъждане

Получените резултати включват оригинални данни, представени в съответствие с поставените задачи. В настоящия дисертационен труд са изследвани пет полиморфизма (*TGFBI* -509 C/T (rs1800469), *IL10* -1082 A/G (rs1800896), *IL12Bpro* (rs17860508), *IL17A* -197 G/A (rs2275913) и *IL17F* -7488 T/C (rs763780)), за които има данни за функционални ефекти върху степента на експресия на съответните генни продукти. За три от полиморфизмите, а именно *TGFBI* -509C/T, *IL10* -1082A/G и *IL12Bpro*, е проучена връзката между генотиповете и инфилтрацията на туморната тъкан с различни популации дендритни клетки, за което не се откриват други подобни проучвания в научната литература. Изследвана е още относителната експресия на гените *TGFBI* и *IL17A* в туморна тъкан от пациенти с КРК.

По отношение на предиктивния капацитет на изследваните полиморфизми, от значение е, че носителите на T/T генотипа по *TGFBI* -509C/T еднонуклеотидния полиморфизъм може да имат по-нисък риск от развитие на КРК (2.74 пъти), но същият генотип се асоциира с прогресията на заболяването (по-дълбока туморна инвазия и по-кратка преживяемост) и може да е фактор, въвличен в съзряването на ДК. Хетерозиготният генотип (A/G) по *IL17A* -197G/A промоторния полиморфизъм се явява протективен фактор за риска от развитие на КРК (2.39-пъти по-нисък риск) в българската популация. Според представеното проучване пациентите с по-ниска инфилтрация със зрели (CD83-позитивни) тумор-инфилтриращи ДК са с по-ниска преживяемост и с по-лоша прогноза за изхода от заболяването спрямо тези с висока инфилтрация. Резултатите от проведените изследвания поощават още, че активността на гените *TGFBI* и *IL17A* е понижена в туморната тъкан спрямо здравата контролна лигавица при пациенти с КРК, като значимо по-ниски нива на *TGFBI* и РНК се наблюдават при пациенти в по-млада възраст.

5. Оценка на изводите и приносите

Изводите са конкретни и отразяват точно получените резултати и тяхното значение. От особено значение е, че някои изследвания се провеждат за първи път в България и представляват принос в световната научна литература.

Приносите са ясно формулирани и могат да бъдат приети без забележки. Някои от съществените приноси са:

- Предложена е хипотеза за супресорното действие на цитокините TGF- β 1, IL-10 и IL-12 върху съзряването на ДК, привлечени към туморното гнездо. В световната литература не се откриват проучвания относно ролята на генотиповете по отношение на *TGFB1* -509C/T, *IL10* -1080 A/G и *IL12Bpro* полиморфизмите в съзряването на популациите ДК в туморната строма и туморната граница.
- Показана е протективната роля на хетерозиготното носителство по отношение на *IL17A* -197G/A полиморфизма в предразположеността към КРК в Българската популация, както и неблагоприятният ефект на А-алела върху прогресията на заболяването.
- Доказана е протективната роля на Т-алела на *TGFB1* -509C/T промоторния полиморфизъм за развитие на КРК и едновременно с това е показана неблагоприятната му роля в прогресията на заболяването при пациенти с КРК. Тези данни са в унисон с предложената в световната научна литература хипотеза за дуалистичната природа на TGF- β 1 в туморогенезата.

6. Преценка на публикационната активност

Във връзка с дисертационния труд са представени три оригинални публикации в пълен текст в списания с импакт фактор с общ ИФ=5,15. В една от публикациите дисертантът е първи автор. Забелязани са четири независими цитирания във връзка с публикациите. Резултатите са представени пред широк кръг от специалисти в национален и световен мащаб - 4 научни форума в чужбина и 2 в страната.

7. Автореферат

Съдържанието и качеството на предложения автореферат отговарят на съдържанието на дисертационния труд, спазени са изискванията и са отразени основните резултати, постигнати в дисертацията.

8. Заключение

Дисертационният труд на Елина Александрова представлява широкообхватно проучване, при което са получени оригинални данни за генотипните разпределения в Българската популация по отношение на еднонуклеотидни полиморфизми при гени, изследвани като рискови фактори за предиспозицията към КРК. Дисертантът има добра теоретична и висока методологична подготовка и умело прилага съвременни молекулярно-биологични подходи. Считаю, че настоящият дисертационен труд напълно *отговаря на изискванията* за съответната научна степен, формулирани от ЗРАСРБ и Правилника за прилагането у в Тракийски университет-Стара Загора. Давам висока *положителна оценка* и предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „Доктор“ по научна специалност „Биохимия“ на Елина Александрова.

12.08.2019 г.


Проф. Диана Иванова, д.б.н.

PhD Thesis Review

From prof. Diana Ivanova, Doctor of Sciences
Dean of the Pharmaceutical Faculty,
Medical University "Prof. P. Stoyanov, MD", Varna

Concerning the PhD thesis of Elina Aleksandrova Aleksandrova,
from the Department of Medical chemistry and Biochemistry of Medical Faculty, Trakia University-
Stara Zagora, themed: "Genetic and cellular factors of the immune system in colorectal cancer". The
thesis has been presented in relation to a procedure for acquiring a scientific **Doctoral** degree in the
field of "Biochemistry"

1. Topicality of the thesis

Colorectal cancer (CRC) is an oncological disease affecting more than 1 million people in the world at the moment and is ranked the leading cause of death by malignancy in both genders. The exact mechanism of its development is not fully elucidated, but the maintenance of chronic inflammation in the body and various genetic factors are considered to be predisposing to the pathogenesis of CRC. The role of the cytokine profile as well as the composition of the inflammatory microenvironment stands out as leading factors in the development and progression of CRC.

Due to the high social significance of this disease, there has been an increased interest in the study of genetic factors involved in the predisposition to CRC in recent years. Numerous polymorphisms have been identified in the genes encoding cytokine molecules, many of which are functional, associated with altered gene expression, and therefore may affect the pathogenesis of various oncological diseases, including CRC. Deregulation of cytokine production affects both tumor progression and antitumor immunity, so such functional polymorphisms can be considered as significant genetic determinants of individual susceptibility and prognosis for CRC outcome.

In this aspect, the research in the present dissertation is dedicated to a topical scientific problem, such as fundamental tumor genetics, and contributes to the acquisition of new data on the contribution of some genetic and cellular factors of the immune system to the expression of CRC in the Bulgarian population.

2. Structure of the thesis

The dissertation submitted contains 123 pages and is illustrated with 48 figures and 16 tables. 276 literary sources are cited, 4 in Cyrillic and 272 in Latin. The dissertation is structured in a traditional style, including sections in appropriate proportions, namely: introduction - 2 pages, literature review and conclusions - 29 pages, purpose and tasks - 2 pages, materials and methods - 9 pages, results - 39 pages, discussion - 14 pages, abstracts - 1 page, contributions - 1 page, bibliography - 25 pages, thanks - 1 page.

3. Evaluation of the Literature review and the applied methods

The literature review provides an in-depth and informative analysis of the available scientific literature related to the role of key cytokines and genetic polymorphisms in antitumor immunity associated with CRC predisposition. The information is presented sequentially in sections addressing separately the role of the cytokines TGF- β 1, IL-10, IL-12, IL-17A and IL-17F, as well as the role of dendritic cells in the molecular pathogenesis of the disease. The review shows the doctoral student's rich awareness of the issue, as well as her ability to understand the essence of the issues and to

summarize them effectively. It is illustrated with 8 figures and 1 table, which very successfully supports the perception of information in the text. Finally, a conclusion is presented, which presents the unclear issues in the discussed topic and motivates the need for the research of the dissertation.

The purpose and tasks of the dissertation are formulated clearly and concretely, and the sequence and the solution of the tasks allows to achieve the ultimate goal: to clarify the role of genetic polymorphisms in genes encoding key cytokines in immune regulation, for the development and progression of colorectal carcinoma in a group from the Bulgarian population, as well as to study the relationship between established genotypes and infiltration of tumor tissue with different dendritic cell populations.

The research was carried out with biological material from a large representative group of 256 patients with CRC and 292 disease-free controls.

The results presented in the dissertation are obtained and analyzed with the skillful use of modern molecular biological methods. Materials and methods are adequately selected to achieve the goals and objectives of the study. The methods are presented informatively and clearly in the Materials and Methods section, including a table of demographic and clinical data of the patients studied. The genotyping methods, primer sequences and the conditions of the reactions performed for each of the polymorphisms (RFLP- or ARMS-PCR techniques) are presented in detail. The use of immunohistochemical techniques and real-time quantitative PCR to determine the relative gene expression of the TGFB1 and IL17A genes complement a rich set of molecular biological assays, which is a high achievement of the dissertation.

Data from all experiments were appropriately analyzed statistically with the application of the software package SPSS v.25 and through the competent application of the relevant statistical methods - descriptive analysis, correspondence analysis (Hardy-Weinberg law), logistic regression analysis, etc.

4. Results and discussion

The results obtained include original data submitted in accordance with the tasks assigned. In the current dissertation, five polymorphisms (TGFB1 -509 C/T (rs1800469), IL10 -1082 A/G (rs1800896), IL12Bpro (rs17860508), IL17A -197 G/A (rs2275913) and IL17F -7488 T/C (rs763780) have been investigated) for which there is evidence of functional effects on the expression level of the respective gene products. For three of the polymorphisms, namely TGFB1 -509C / T, IL10 -1082A / G and IL12Bpro, the relationship between genotypes and tumor tissue infiltration with different dendritic population populations has been investigated, and no other similar studies have been found in the scientific literature. The relative expression of TGFB1 and IL17A genes in tumor tissue from CRC patients was also investigated.

With respect to the predictive capacity of the polymorphisms examined, it is important that carriers of the T/T genotype according to TGFB1 -509C/T single nucleotide polymorphism may have a lower risk of developing CRC (2.74-fold), but the same genotype is associated with disease progression (deeper tumor invasion and shorter survival) and may be a factor involved in DC maturation. The heterozygous genotype (A/G) of IL17A -197G/A promoter polymorphism is a protective factor for the risk of developing CRC (2.39-fold lower risk) in the Bulgarian population. According to the study presented, patients with lower infiltration with mature (CD83-positive) tumor-infiltrating DCs have a lower survival rate and a worse prognosis for the outcome of the disease than those with high infiltration. The results of the studies also show that the activity of the

TGFB1 and IL17A genes is decreased in tumor tissue relative to the healthy control mucosa in CRC patients, with significantly lower levels of TGFB1 mRNA observed in younger patients.

5. Evaluation of the conclusions and contributions of the thesis

The conclusions are specific and reflect the results obtained and their significance. It is of particular importance that some of the research experiments are conducted for the first time in Bulgaria and represent a contribution to the world scientific literature.

The contributions are clearly outlined and can be accepted without comments. Some of the significant contributions are:

- A hypothesis for the suppressive action of the cytokines TGF- β 1, IL-10 and IL-12 on the maturation of DCs attracted to the tumor well has been proposed. No studies on the role of genotypes with respect to TGFB1 -509C/T, IL10 -1080 A/G and IL12Bpro polymorphisms in the maturation of DCs in the tumor stroma and tumor border have been found in the world literature.
- The protective role of the heterozygous carrier with respect to IL17A -197G/A polymorphism in the predisposition to CRC in the Bulgarian population is shown, as well as the adverse effect of the A-allele on the progression of the disease.
- The protective role of the T-allele of the TGFB1 -509C/T promoter polymorphism in the development of CRC has been demonstrated and at the same time its adverse role in the progression of the disease in patients with CRC has been demonstrated. These data are in line with the hypothesized hypothesis of the dualistic nature of TGF- β 1 in tumorigenesis in the world scientific literature.

6. Assessment of the publication activity

In relation to the dissertation, three original full-text publications are presented in journals with impact factor with a total IF of 5.15. In one of the publications, Elina Aleksandrova is the first author. Four independent citations were noted in relation to the publications. The results are presented to a wide range of specialists nationally and globally - 4 scientific forums abroad and 2 in the country.

7. Abstract

The content and quality of the proposed abstract corresponds to the content of the dissertation, meets the requirements and reflects the main results achieved in the dissertation.

8. Conclusion

Elina Aleksandrova's dissertation is a wide-range study, which obtained original data on genotypic distributions in the Bulgarian population with respect to single nucleotide polymorphisms in genes examined as risk factors for the predisposition to CRC. The PhD student has good theoretical and high methodological background and skillfully applies modern molecular biological approaches. I believe that this dissertation fully meets the requirements for the relevant scientific degree, formulated by the ZRASRB and the regulations for the implementation of Trakia University-Stara Zagora. I give a high positive evaluation of the submitted dissertation and recommend the Honorable Scientific Jury to award a Doctoral degree in Biochemistry to Elina Aleksandrova.