



ДО НАУЧНИЯ СЕКРЕТАР
НА МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ,
ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ГР. СТАРА ЗАГОРА
ПРОФ Д-Р- АННА ТОЛЕКОВА, ДМ,

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. Люба Динева Митева, дб

Катедра Молекулярна биология, Имунология и медицинска генетика,
Медицински факултет, Тракийски университет, гр Стара Загора
Тел: +39-42-664274

e-mail: lmiteva@mf.uni-sz.bg; lubamiteva@yahoo.com

член на научното жури определено със Заповед № 2101/18.07.2019 г. на Ректора на Тракийски университет гр. Стара Загора

**На дисертационен труд за присъждане на образователно научна степен
„Доктор“**

Професионално направление 4.3. „Биологически науки“

Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“
докторантска програма „Биохимия“.

Автор на дисертационния труд: Елина Александрова Александрова

Тема на дисертационния труд: Генетични и клетъчни фактори на имунната система при колоректален карцином

Катедра: Медицинска химия и Биохимия, Медицински факултет, Тракийски университет

Научен ръководител: Проф. Татяна Влайкова, дб

Научен консултатнт: Проф. д-р Мая Гълъбова, дм

1. Биографични данни за кандидата:

Елина Александрова е родена през 1984г, завършила средното си образование в Математическа гимназия в гр. Русе, с профил биология. В периода от 2002-2009 придобива последователно бакалаварска степен по молекулярна биология и магистърска степен по медицинска химия от Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ гр. София. От 2009г. започва работа към лаборатория по Молекулярна патология, Медицински факултет, Тракийски университет на длъжност биолог. От 2014г. е зачислена в редовна докторантура по докторантска програма „Биохимия“ Професионално направление 4.3.

„Биологически науки“ Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“ към Медицински факултет на Тракийски университет, гр. Стара Загора.

2. Структура, актуалност и съдържание на дисертационния труд:

Дисертационният труд с автор Елина Александрова е представен във вид и обем, съответстващ на изискванията на ЗРАСРБ и ПРАСТрУ и съдържа: заглавна страница, съдържание, увод, литературен обзор, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси и библиография.

Дисертационният труд обхваща 123 стандартни страници и е онагледена с 48 фигури и 16 таблици, структурирана в следните раздели: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 28 стр., Цел и задачи -2 стр., Материали и методи – 9 стр., Резултати– 40 стр., Обсъждане – 15 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Библиография – 25 стр. съдържаща 277 литературни източника, от които 4 на български език, останалите – на английски език, като над 50 са от последните 5 години.

Дисертационният труд на Елина Александрова е насочена към проучване на значението на генни полиморфизма в цитокинови гени за генетичното предразположение, прогресията и преживяемост на пациентите с колоректален карцином (КРК), както и асоциацията им с различни популации дендритни клетки инфилтраращи туморната тъкан.

Колоректалният карцином е едно от най-честите онкологични заболявания в развитите страни, вкл. в България. Въпреки значителния брой проучвания през последните години относно патогенезата и молекулните механизми на КРК, все още механизмите, лежащи в основата на дебелочревната трансформация остават неизяснени напълно. КРК е мултифакторно заболяване с безспорно доказана генетична основа и в тясна връзка с хронично възпаление в гастроинтестиналния тракт. **Предвид това, намирам темата на настоящият дисертационен труд за безспорно актуална и съвременна.**

Литературният обзор е написан подробно и изчерпателно, като е използван много добър научен стил и е онагледен с 8 фигури и 1 таблица. В раздела са представени обобщени данни относно епидемиология, рисковите фактори за развитието на КРК и прилаганата система за класификация и стадиране на КРК. Разгледани са основните етапи в трансформацията на нормалния епител към аденом и карцином, като е обърнато специално внимание на професионалните антиген представящи клетки – дендритните клетки (ДК), различните субпопулации ДК инфилтриращи първичния тумор, както и повърхностните маркери, които се използват за инуохистохимичното им идентифициране и качествяване на функционалната им активност.

Изтъкната е съществената роля на цитокините като основни регулаторни молекули на имунния отговор с ключово значение за реализация на протективен имунен отговор от клетките на имунна система, в това число и ДК. Логично, над половината от обема на литературния обзор отразява най-важните изследвания и съвременни знания за цитокините въввлечени в имунопатогенезата на КРК. Подробно описани са цитокините обект на настоящия дисертационен труд - TGF- β 1, IL-10, IL-12 и IL-17, техните биохимичните характеристики, индуцираната сигнална трансдукция, ролята в имунния отговор и имунопатогенезата на КРК, както и известните генни варианти в техните гени.

Имунорегулаторните цитокини TGF- β 1 и IL-10 са разгледани подробно в синхрон със съвременните разбирания за тяхната функционална активност, както по отношение на Т-

клетките така по отношение на съзряването на ДК. TGF- β 1 е представен, като цитокин с дуалистична роля - с анти-туморна активност в ранните етапи на канцерогенезата и протуморна в по-късните етапи на туморната прогресия чрез способността му да моделира туморната микросреда. Представени са данни за организацията на човешките гени кодиращи TGF- β 1 и IL-10, като е обърнато специално внимание на промоторните полиморфизми - 509 C/T и -1082A/G – обект на проучванията. Семейства на проинфламаторните цитокини IL-12 и IL-17 и тяхната роля в Th1 и Th17 медирана имунопатогенезата на КРК са ясно представени в литературния обзор, с фокус върху функционалните генни полиморфизми в техните гени, респ. *IL12Bpro*, *IL17A* -197A/G и *IL17F* 7488T/C. Много ясно и точно са очертани дебатиранията противоречия и/или непълноти в научната литература по темата, представени в заключението от литературния обзор от автора Елина Александрова, което показва нейната аналитична мисъл и способност да обобщава голяма по обем научна информация.

Задълбоченият анализ на литературните данни дава възможност на Е. Александрова да формулира ясно поставената цел на настоящия дисертационен труд, а именно *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.*

За постигането на тази цел Е. Александрова си поставя **6 конкретни задачи**, които очертават основните стъпки за реализиране на поставената цел.

За целите на проучването са изследвани ретроспективно общо 256 пациенти с колоректален карцином, които са генотипизирани общо 5 полиморфизми в цитокинови гени – *IL10*, *TGFB1*, *IL17A*, *IL17F* и *IL12B* чрез алел-специфичен PCR или рестрикционен анализ след PCR. Охарактеризирани са различни популации ДК и тяхната активност използвайки имунохистохимичните маркери S100, CD1a, CD11c, CD123 и CD83 в туморната тъкан и туморна граница. Проведени са асоциативни проучвания относно тяхната роля за генетично предразположение, прогресия и преживяемост на пациентите с КРК чрез подходящи статистически анализи. Оценена е и генната ескресия на *TGFB1* и *IL17A* на ниво иРНК в туморната тъкан чрез qPCR. Методите, използвани при провеждане на експерименталната част на дисертацията, съответстват на поставените задачи и са детайлно описани (включително с 4 таблици), което позволява да бъдат изпълнени от независими изследователи.

Резултатите от дисертационния труд са онагледени с 40 фигури (9 от които са снимков материал) и 11 таблици.

Представени са данни за значим протективен ефект на носителството на ТТ-генотип по *TGFB1* -509C/T полиморфизма и същевременно асоциацията му с по-кратка преживяемост и по-висок брой незрели ДК в туморното микрообкръжение в сравнение с носителите на С-алела. По отношение на *IL10* -1082A/G и *IL12Bpro* полиморфизмите, докторанта установява, че въпреки, че нямат значим ефект върху генетичната предиспозиция, вероятно повлияват съзряването на ДК, като -1082*GG-генотипа се асоциира с по-висок брой зрели ДК в туморната граница, а генотип-11 по *IL12Bpro* се асоциира с по-ниска инфилтрация с CD1a-позитивни (незрели) ДК в туморната граница. Хетерозиготният генотип по *IL17A* -197 G/A е представен като значим протективен фактор както и като

неблагоприятен фактор за тежестта на колоректален карцином. Миссенс полиморфизмът в *IL17F* 7488 T/C е представен като генетичен фактор без значим ефект за генетично предразположение към КРК.

В дискусията дисертантът умело коментира получените резултати и ги съпоставя с известните данни от научната литературата при други популации. Докторантът, Елина Александрова анализира установените асоциации генотип-фенотип в светлината на функционалният ефект на изследваните полиморфизми върху генетичната предиспозиция, прогресия, преживяемост и ангажираност на ДК в туморното микрообръжение. Въз основа на логичният анализ на данните са изведени са общо 6 извода, които съответстват напълно на получените експериментални резултати.

Докторантът извежда 6 научно-теоретични приноси на своя дисертационен труд – 2 оригинални и 4 потвърдителни, с които съм съгласна и които очертават насоки за бъдещата работа на докторанта.

Към материалите по защитата са представени **3 научни статии** в пълен текст по темата на дисертацията, **в списания с импакт фактор, ранкирани в Q3**. В една от тях докторанта Елина Александрова е първи автор ($IF_{2017}=1.766$), и са забелязани общо 4 цитата от чуждестранни автори. Резултатите от дисертацията са представени също и на 6 научни форума (4 в чужбина и 2 в страната), в 5 от които Е. Александрова е първи автор. Публикационната дейност на докторантката е в съответствие с изискванията, определени в Правилника на ТрУ и изискуемите минимални изисквания съгласно ЗРАСРБ за научно-образователна степен „доктор“ в област 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки по докторантска програма „Биохимия“

Авторефератът е оформен според изискванията и отразява основните резултати, тяхното обсъждане, изводи и научните приноси на дисертационния труд.

Към дисертационния труд имам следните въпроси, бележки и препоръки:

- На кой от цитокините от IL-12 семейството според вас се дължи най-вече, наблюдаваната от вас и с най-силна статистическа значимост, асоциация между носителството на генотип-22 от *IL12Bpro* полиморфизма и s100 позитивните ДК в туморната строма (таблица 12, фигура 36 и 37)?
- Вторият ми въпрос касае асоциацията между нивата на гена експресия на *TGFBI* и възрастта на пациентите с КРК (фигура 79). Възможно ли е според вас понижена експресия на *TGFBI* при „най-младите“ пациентите да е резултат от свързаните с възрастта функционални промени, които да се наблюдават и в норма, при здрави хора?
- Имам известни резерви по отношение на интерпретацията на установената асоциация между носителство на даден генотип и броя на инфилтрираните ДК в туморната граница или туморната строма. Предвид, че основните молекули с хемоатрактантна функция са хемокините, вероятно наблюдаваната взаимовръзка не е директна, а опосредствана от ефекта на цитокините върху експресията на хемокинови рецептори и техните лиганди, участващи в хемотаксиса на ДК. В тази връзка е една от моите препоръки за бъдеща работа да се проучат напр. хемокиновите рецептори, експресирани от туморните клетки и тумор

инфилтрираните ДК, които биха могли да бъдат индуцирани от изследваните цитокини.

3. Заключение

Дисертационният труд на Елина Александрова 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 за изясняване на молекулните механизми на колоректален карцином при човек, част от които са публикувани в 3 научни статии в пълен текст, в списания с импакт фактор, ранкирани в Q3. Задълбочените теоретични знания и натрупания експериментален опит на докторантката са отлична предпоставка за бъдещото ѝ успешно развитие като учен в областта на биохимията на човека.

Оценявам положително настоящия дисертационен и считам, че отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и приетият от ТрУ правилник за неговото приложение.

Всичко това ми дава основание убедено да гласувам положително, като член на Научно жури, да се присъди на Елина Александрова Александрова образователната и научна степен „Доктор” в област 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки по докторантска програма „Биохимия“.

гр Стара Загора

22.08.2019 г.

Подпис:



/доц. Люба Мтева, дб/

TO THE SCIENTIFIC SECRETARY
FACULTY OF MEDICINE,
TRAKIA UNIVERSITY
STARA ZAGORA
Prof. Dr. ANNA TOLEKOVA, MD, PhD

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
tel: +39-42-664274

e-mail: lmiteva@mf.uni-sz.bg; lubamiteva@yahoo.com

A member of the Scientific Jury defined by Order No. 2101 / 18.07.2019 of the Rector of the Trakia University, Stara Zagora

Of PhD thesis in Professional area 4.3. "Biological Sciences"

Higher Education Area 4. "Natural Sciences, Mathematics and Computer Science"
PhD program in Biochemistry.

Author of PhD thesis: Elina Aleksandrova Aleksandrova

Title of PhD thesis: Genetic and cellular factors of the immune system in colorectal cancer

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

Scientific Supervisor: Prof Tatyana Vlaykova, PhD

Scientific Advisor: Prof Maya Gulubova, MD, PhD

1. Author's personal data:

Elina Aleksandrova, born in 1984, graduated from the Secondary School of Mathematics in Rousse with a profile "Biology". In the period of 2002-2009, she obtained a Bachelor's Degree in Molecular Biology and a Master's Degree in Medical Chemistry from Sofia University "St. Kliment Ohridski" Sofia. Since 2009, she has worked at the Laboratory of Molecular Pathology, Faculty of Medicine, Trakia University as a biologist. Since 2014, she has been enrolled in a full-time PhD program under the doctoral program "Biochemistry" Professional Degree 4.3. "Biological Sciences" Higher Education Area 4. "Natural Sciences, Mathematics and Informatics" at the Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora Bulgaria.

2. Organization of the PhD thesis and General comments

The PhD thesis by Elina Aleksandrova is presented in the form and volume corresponding to the requirements of ZRASRB and PRASTRU. It includes: title page, content, introduction, literature review, material and methods, results, discussion, conclusions, contributions and references.

The PhD thesis comprises 123 pages and is outlined with 48 figures and 16 tables, structured in the following sections: Introduction - 2 pages, Literature Review - 28 pages, Aims and objectives - 2 pages, Materials and Methods - 9 pages, Results - 40 pages, Discussion - 15 pages, Conclusions - 1 page, Contributions - 1 page, References - 25 pages containing 277 references, 4 of which in Bulgarian, the rest - in English, with over 50 from the last 5 years, showing the topical issues.

The subject of Elina Aleksandrova's thesis is focused on the involvement of gene polymorphisms in cytokine genes in the genetic predisposition, progression and survival of patients with colorectal cancer (CRC), as well as their association with different populations of dendritic cell (DC) infiltrating the tumor tissue.

Colorectal cancer is one of the most common cancers in developed countries, including Bulgaria. Despite the considerable number of studies focused on the molecular pathogenesis of CRC, the underlying mechanisms of colorectal cell transformation remain unclear. CRC is a multifactorial disease with indisputably proven genetic basis and closely related to gastrointestinal chronic inflammation. Respectively, I find the topic of this PhD thesis as topical and fundamental.

The Literature review is written with details, using a very good scientific style, illustrated with 8 figures and 1 table. This section presents summary data on the epidemiology, risk factors for development, the used system for the classification and staging of CRC. The main steps in the transformation of the normal epithelium to adenoma and carcinoma are presented, with particular attention to professional antigen presenting cells - dendritic cells (DCs), subpopulations of DCs infiltrating primary tumors, and surface markers used for immunohistochemistry identification and functional characterization of DC. The essential role of the cytokines as the main regulators of the immune response, critical for the realization of a protective immune response by a plethora of immune cells, including DCs, has been emphasized.

More than half of the volume of the literature review presents the most current knowledge about cytokines involved in the immunopathogenesis of CRC. The cytokines, subjects of this PhD thesis include TGF- β 1, IL-10, IL-12, and IL-17. Their biochemical characteristics, induced signal transduction, role in the immune response and immunopathogenesis of CRC are described in detail in addition to known gene variants in their genes. This part provides a very good background for understanding the rest of the thesis.

Immunoregulatory cytokines - TGF- β 1 and IL-10, are shown in details in agreement with the recent knowledge of their fictional activity with respect to T cells and DCs activation, differentiation, and plasticity. TGF- β 1 has been presented as a cytokine with dual role in cancerogenesis: anti-tumoral activity in the early stages of carcinogenesis and pro-tumoral in the advanced stages of tumor progression. The gene organization of human genes encoding TGF- β 1 and IL10 are presented, with particular attention to the promoter single nucleotide polymorphisms -509 C/T and -1082A/G, respectively. Families of pro-inflammatory cytokines IL-12 and IL-17 and their role in Th1 and Th17 mediated CRC immunopathogenesis are clearly described in the literature review, focusing on functional gene polymorphisms in their genes,

respectively: IL12Bpro, IL17A -197A/G and IL17F 7488T/C. The controversies and/or incomplete data in the scientific literature, are very clearly and accurately outlined in the conclusion of the literature review by the author. This part shows her analytical thought and ability to summarize a large amount of scientific information.

The in-depth analysis of the literature allows E. Aleksandrova to formulate the clearly stated aim of this PhD thesis: to investigate the role of selected cytokine gene polymorphisms (*TGFB1* -509C/T, *IL10* -1082A/G, *IL12Bpro*, *IL17A*-197A /G and *L17F* 7488T/C) for the predisposition and progression of CRC among patients from the Bulgarian population and to evaluate the influence of the studied polymorphisms on DCs infiltration in tumor microenvironment. To achieve this goal E. Alexandrova outlined 6 specific objectives.

A total of 256 CRC cases are included in this retrospective study. Genotyping of 5 gene polymorphisms in cytokine genes - IL10, TGFb1, IL17A, IL17F и IL12B was performed by amplification refractory mutant system – PCR and restriction fragment length polymorphism-PCR assays. For immunohistochemical staining of DCs populations in tumor stroma and in the invasive margin of the tumor monoclonal mouse anti-human S100, CD1a, CD11c, CD123, and CD83 antibodies were used. The associative studies on the role of the investigated polymorphisms in CRC predisposition, progression and survival were performed by suitable statistical analysis. The quantitative real time PCR (RT-qPCR) was performed to investigate the gene expression levels of *TGFB1* and *IL17A* genes in tumor tissue samples. The methods used are adequate in regards to the aim and purpose of the experimental part of the thesis. The Materials and Methods section is highly descriptive (including 4 tables) allowing to be reproduced by independent researchers.

The Results section includes 40 figures (9 of which are photographs) and 11 tables. The data show a significant protective effect of the TT genotype of the *TGFB1* -509C/T polymorphism for CRC risk simultaneously with its association with worse survival rate and a higher number of immature DCs in the tumor microenvironment compared to the C allele carriers. With respect to *IL10* -1082A/G and *IL12Bpro* polymorphisms, the author has found that both polymorphisms do not have a significant effect on genetic predisposition to the studied disease. However, they have been associated with DC maturation, the -1082*GG genotype was associated with a higher number of mature DCs in the tumoral stroma and *IL12Bpro* genotype-11 was associated with lower infiltration with CD1a-positive (immature) DCs in the tumor margin. The heterozygous genotype of *IL17A* -197 G/A has been shown as a protective predisposing factor and as significant risk factor for the severity of CRC. Missense polymorphism in *IL17F*, 7488 T/C has been presented as a genetic factor with no significant effect on the genetic predisposition to CRC.

In the Discussion, the author adequately comments the obtained results and compares them with known data from the scientific literature among other populations. Elina Aleksandrova analyzes the established genotype-phenotype associations in the light of the functional effect of the studied polymorphisms on the genetic predisposition, progression, survival of CRC and involvement of DCs in the tumor microenvironment. On the basis of the logical analysis of the obtained results, 6 conclusions have been summarized. In addition, the PhD student drew 6 scientific-theoretical contributions to her thesis - 2 original and 4 confirmatory, which outlines directions for future work.

In accordance with the requirements, 3 full-length scientific papers on the topic of the PhD thesis published in journals with impact factor, ranked in Q3, were included. Elina Aleksandrova is the first author of one of them ($IF_{2017} = 1.766$). A total of 4 citations from foreign authors were noticed. The majority of the obtained results are also presented in 6 scientific conferences (4 international and 2 Bulgarian), in 5 of which E. Aleksandrova is the first author.

The publication activity of the PhD student is in accordance with the requirements of the Rules of the Trakia University and the required minimum scientific parameters according to the ZRABRB for the PhD degree in field 4. Natural sciences, mathematics and informatics; Professional area 4.3. Biological Sciences, the Doctoral Program in Biochemistry

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

Concerning the PhD thesis I would like to ask the following questions and to share some minor points and recommendations:

- Which of the IL-12 family cytokines do you consider engaged in the reported significant association between the IL12Bpro polymorphism genotype-22 and the s100 positive DCs in the tumor stroma (Table 12, figures 36 and 37)?
- My second question concerns the association between the levels of TGFBI gene expression and the age of CRC patients (Figure 79). In your opinion, is it possible that the decreased expression of TGFBI in the "youngest" patients are a result of age-related functional changes that are also observed in healthy people?
- My restraints concern the interpretation of the established association between genotype of investigated cytokine polymorphisms and the number of infiltrating DCs in the tumor margin or stroma. The major chemoattractant molecules are chemokines and the observed relationship probably is not direct. It could be mediated by the effect of cytokines on the expression of chemokine receptors and their ligands more tightly involved in DC chemotaxis. This is one of my recommendations for further work, to explore eg. chemokine receptors expressed by tumor cells and tumor-infiltrating DCs that could be induced by the studied cytokines.

3. Final evaluation statement

Elina Aleksandrova's PhD thesis certainly meets the requirements for obtaining the PhD degree. The author of the thesis has proved her ability to perform research, to interpret scientific results and to describe them at the international standard. Significant scientific contributions to elucidate the molecular mechanisms of colorectal cancer have been achieved. The majority of obtained data have been published in 3 full-length scientific papers in journals with impact factor, ranked in Q3. The solid theoretical knowledge and the experimental experience of the PhD student are

prerequisite for her future successful development as a scientist in the field of human biochemistry.

I positively appraise this PhD thesis and think that it fully complies with the requirements of the ZRASRB and the rules adopted by the Trakia University for its implementation.

All of this gives me a reason to vote positively as a member of the Scientific Jury to award Elina Alexandrova Alexandrova a PhD degree in science in field 4. Natural sciences, mathematics and informatics; Professional area 4.3. Biological Sciences under the Doctoral Program in Biochemistry.

Stara Zagora

22.08.2019

Signature:

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, enclosed within a circular scribble.

/assoc. prof Lyuba Miteva, PhD/