

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Иво Маринов Кременски

на

дисертационен труд на

ПАВЛИНА ЙОРДАНОВА ЧЕЛЕНКОВА

Тема: **„РОЛЯ НА ФАКТОРИ, МОДУЛИРАЩИ ИНДИВИДУАЛНИЯ РЕПАРАЦИОНЕН КАПАЦИТЕТ ВЪВ ФИЗИОЛОГИЧНИ И ПАТОЛОГИЧНИ УСЛОВИЯ“**

**За присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“**

Професионално направление: 4.3 „Биологични науки“
(Молекулярна биология - Рекомбинантна ДНК)

Шифър на научната област: 01.06.04 (молекулярна биология)

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Доц. Стоян Александров Чакъров „доктор“

Катедра "Биохимия" на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Представеният за рецензия дисертационен труд попада в областта на изследванията на генотип-фенотипните корелации при заболяванията с мултифакторна генеза. Това е интензивно развиваща се област на изследователската дейност с много висок потенциал за директно приложение в клиничната медицина. Става дума за подход на молекулярно ниво към изследването на етиологията и патогенезата на различните болести и състояния и, съответно, на възможностите за интервенция на молекулярно ниво. Молекулярният подход в съвременната медицина дава възможност поставянето на диагнозата, прогноза, предоставяне, оценка на риска в поколенията, генетична консултация, оптимизиране на лечението от гледна точка на молекулярните механизми на зараждане и развитие на болестния процес и проследяването на хода на заболяването. Последното осигурява значително повече възможности във връзка с профилактиката и превенцията, ранната диагноза и евентуалните варианти за терапевтична намеса. В пряка връзка с молекулярния подход е и модерното направление на „прецизната медицина“. Тя дава възможност за индивидуален подход към пациента с цел оценка на евентуалния успех от дадено лечение и осигуряване на надеждна прогноза за развитието на патологичния процес при конкретния индивид чрез анализ на неговия уникален индивидуален генотип и взаимодействието с факторите на средата на живот и други специфични фактори.

Един от основните проблеми пред клинициста винаги е бил неизбежният процент от пациенти с дадено заболяване, при които то протича атипично (което затруднява диференциалната диагноза) и/или дава парадоксален отговор на приложеното лечение, и/или развива рядко срещани или неочаквани усложнения. Подобни са и проблемите при оценка на риска от развитие на дадено заболяване - колкото и точни да са методите на оценка, базирани

на популационна статистика на заболяемостта при групи индивиди с различни рискови фактори за конкретното заболяване, винаги се формира подгрупа от индивиди, при която заболяването изобщо не се развива или се развива по различно време и с различна картина от "средното" за групата. И в двата случая обяснението се търси в индивидуалните фактори - генетични и фактори на средата, които действат при индивидите, които се отклоняват от статистическото очакване. При заболяванията с мултифакторна генеза този тип отклонения са особено изразени, тъй като отделните фактори могат да имат различна тежест и се срещат в много и различни комбинации при различните индивиди.

Известно е, че способността за поправка на увреждания в ДНК и свързаната с това индукция на апоптозата при увредени клетки и последващата им замяна с нови клетки могат значително да се различават при млади и възрастни индивиди, при мъжете и жените, при здравите индивиди и при тези с различни заболявания и след лечение с различни медикаменти. Вече се знае и че относително голям дял от капацитета за поправка на увреждания и регенерация на увредени клетки и тъкани е генетично обусловен. Въз основа на това се формира рискът от развитие на много често срещани заболявания като рака, диабет тип 2, различни дегенеративни заболявания и други и се модулира ходът и изходът на вече развили се заболявания.

В рецензирания от мен дисертационен труд е направен анализ и обобщаване на тежестта на генетичните фактори, формиращи индивидуалния капацитет за поправка на ДНК, които влияят върху риска от няколко типа често срещани заболявания и състояния с висока социална значимост. Основно място в работата е отделено на факторите, повишаващи риска от церебрално-съдови инциденти (инсулти) в българската популация. Като се има предвид, че България в момента е на печалното първо място по мозъчни инсулти в света, тази разработка попада в центъра на актуалните проблеми на българската медицина и здравеопазване. Известно е, че рискът от повторен инсулт след първи такъв или след един или повече епизоди на транзиторна мозъчна исхемия се повишава и остава трайно повишен в продължение на поне една година след инцидента. Оценката на риска от първи мозъчен инсулт към момента се извършва с помощта на т. нар. скорове, в които като фактори участват артериалното налягане, телесното тегло, данните за дислипидемия, диабет, ритъмни разстройства (специфично предсърдна фибрилация), тютюнопушене и фамилна история. Оценката на риска по този начин е по-скоро качествена (подразделяне на групи от "висок", "умерен" и "нисък" риск) и грешката може да бъде значителна.

В рамките на работата по дисертационния труд са установени параметрите на нормалната вариантност по отношение на седем маркера за индивидуален репаративен капацитет и четири спомагателни маркера, имащи отношение към риска от съдови инциденти в българската популация. Това е съпоставено с особеностите на подбрана по възраст и пол пациентска популация с история за един или повече церебрално-съдови инциденти. Намерени са статистически значими различия между разпределението на различните алели на изследваните полиморфизми на гени, кодиращи белтъци, участващи във формирането на индивидуалния капацитет за поправка на ДНК между клинично здравите индивиди и пациентите с инсулти. Въз основа на това е идентифициран един основен (XPCins83) и четири допълнителни (XPD Lys751Gln, XRCC3 Thr241Met, TP53 Pro72Arg, APOE) фактора за повишаване на риска от церебрално-съдов инцидент във възрастовата група 20-65 години в българската популация. За един от тези маркери са установени полово-зависими различия в риска от церебрално-съдов инцидент, които не са описани в литературата до този момент.

Към този панел от маркери е добавен и допълнителен фенотипен маркер за капацитета за самоподновяване на клетъчни популации (средна дължина на теломери) и е извършена първична оценка на резултатите при здрави индивиди и при индивиди с инсулти. Разработената от докторантката методология за оценка на риска от инсулт въз основа на особеностите на индивидуалния капацитет за поправка на увреждания в ДНК лесно може да бъде доразвита в спомагателен инструмент, подпомагащ и прецизиращ оценката на риска от първи инсулт и от възникване на усложнения при пациентите с един или повече церебрално-мозъчни инциденти.

Другият тип често срещано социално значимо заболяване, което е изследвано в рамките на рецензирания дисертационен труд от гледна точка на ролята на генетичните фактори, формиращи индивидуалния капацитет за поправка на ДНК, е карцином на млечната жлеза. В дисертационния труд е проведен анализ на алелното разпределение на четири генетично обусловени маркера на капацитета за поправка на увреждания в ДНК и един от тях (ХРСins83) е идентифициран като рисков фактор, свързан с повишаване на риска от развитие на карцином на млечната жлеза. Този маркер в рамките на това изследване е идентифициран и като рисков фактор за церебрално-съдови инциденти. Тези ефекти се осъществяват по всяка вероятност чрез понижаване на разпознаваемостта на увреждания в ДНК от белтъка, кодиран от вариантния алел на полиморфизма. Намерени са и данни за соматична мутагенеза с преференциално делетиране на един от двата алела на често срещания полиморфизъм TP53 Pro72Arg в карциноми на млечната жлеза при хетерозиготни носители. Не само в България ракът на млечната жлеза е на първо място по честота при жените (над 25 % от всички ракови заболявания) и се характеризира с висок процент на късни диагнози, ниска петгодишна преживяемост и висока смъртност. От тази гледна точка разработването на инструменти за оценка на индивидуалния риск е много важно за България. От чисто изследователска гледна точка, резултатите в тази връзка са сериозен научен принос, тъй като до момента данни за такъв механизъм са намерени основно за тумори на маточната шийка и тумори на главата и шията, свързани с предходна инфекция с HPV.

В дисертационния труд е засегнат още един сериозен, но до този момент много слабо проучван изследователски проблем, а именно качествата на клетъчните линии, използвани за изследователска дейност и техният про-карциногенен потенциал. Известно е, че продължителното съхранение и размножаване на клетки *in vitro* е свързано с внасяне на необратими качествени и количествени изменения в техния геном. Нерядко тези изменения водят до преждевременно стареене на клетките или променят фенотипа на клетъчната линия, превръщайки я в ракова. Към момента е трудно да се предскаже дали дадена човешка клетъчна линия ще може да бъде стабилизирана с минимална промяна на генотипа и фенотипа си и, съответно, приложението на човешки клетъчни линии за практически клинични цели е строго ограничено поради опасения за безопасността при използването им. Това важи с особена сила за линиите от стволови клетки, които по дефиниция трябва да имат едновременно висок пролиферативен и висок диференциационен потенциал.

Към момента, често използваните човешки клетъчни линии са много добре охарактеризирани по отношение на основните параметри, които оказват влияние върху култивирането им *in vitro*, но никъде в литературата не е описан анализ на капацитета им за поправка на ДНК. Като се има предвид, че част от тези линии са изолирани от пациенти с неопластични заболявания (левкемии, рак на шийката на матката) и се поддържат *in vitro* десетилетия наред, ми се струва, че е много важна оценката на техния капацитет за справяне с генотоксични увреждания. Последното по всяка вероятност съдържа допълнителна информация

за механизмите, по които тези ракови клетки преодоляват наложените от природата бариери към неограничена пролиферация.

В настоящия дисертационен труд са изследвани параметрите на индивидуалния репаративен капацитет и е съставена обща генетична характеристика на две стандартни обезсмъртени клетъчни линии и на една човешката стволково-клетъчна линия, получена в България. Извършен е анализ на находките и са намерени изменения в капацитета за поправка на ДНК, които повишават риска от геномна нестабилност и ракова трансформация *in vitro* и, вероятно, *in vivo*.

В допълнение, в дисертацията са потвърдени предходни данни за честотата на разпространение на най-често срещаните протромботични фактори (MTHFR C677T, Factor V Leiden, PT G20210A, PAI4G/5G) в българската популация от здрави индивиди. Също така е потвърдено, че за повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти основна роля играе порядко срещаната мутация PT G20210A. Това е принос от гледна точка на това, че носителството на тези генетични изменения е много често по целия свят и, съответно, популационният риск от свързаните с носителството усложнения никак не е малък.

Считам, че разработената в дисертационния труд методология за оценка на индивидуалния капацитет за поправка на увреждания в ДНК може да подпомогне значително оценката на риска, диагностиката, мониторинга и прогностиката на изхода при често срещани социално значими заболявания с начало след 40 години, информираното въвеждане на промени в начина на живот и подбора на терапии, подходящи за конкретния пациент.

Получените от докторант Челенкова резултати са публикувани в осем научни статии в индексирани списания. Резултати са докладвани и на общо осем научни конференции. Считам, че представеният ми проект за автореферат отразява коректно резултатите от дисертационния труд, техният анализ и основните изводи.

Дисертационният труд е изготвен според изискванията за такъв тип научни разработки и съдържа всички необходими компоненти. Той покрива изцяло изискванията за придобиване на научната и образователна степен „Доктор“.

Може да се направи изводът, че докторант Павлина Челенкова е методичен и компетентен изследовател в областта на молекулярната биология и молекулярните основи на индивидуализирания подход в медицината. Считам, че работата заслужава висока оценка и убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Павлина Йорданова Челенкова научната и образователна степен „Доктор“.

19.01.2018 г.

проф. д-р И. Кременски