

СТАНОВИЩЕ

на дисертационния труд на ас. Галя Михайлова Михайлова,
редовен докторант в Катедра «Биохимия, молекулна медицина и
нутригеномика», Факултета по фармация,
Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна

на тема: „Скрининг и функционален анализ на нови анти-комплементни
автоантитела в хода на системен лупус еритематодес”

представен за присъждане на научно-образователна степен “ДОКТОР”,
по Научна специалност „Биохимия“

Професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика

изготвена от проф. Татяна Иванова Влайкова, д.б.

Катедра „Медицинска химия и биохимия“, Медицински факултет,

Тракийски Университет, Стара Загора,

тел: 00888 002438, e-mail: tvlaykova@abv.bg

1. Актуалност на дисертационния труд

Системният лупус еритематодес (СЛЕ, SLE) е хронично аутоимунно заболяване, което има широкоспектърни органични прояви. Лупусният нефрит (ЛН) е една от най-сериозните, значими и чести прояви на СЛЕ. ЛН се характеризира с по-висока заболеваемост и смъртност в сравнение със СЛЕ без бъбречно засягане.

В световен мащаб се полагат много усилия за намиране на биомаркери на заболяването с цел по-ранно поставяне на диагнозата и по-точна оценка на активността му. Добре е известно, че в патогенезата на СЛЕ и ЛН съществена роля играе системата на комплемента, като автоантитела срещу компонентите на комплемента, главно срещу C1q (анти-C1q автоантителата) са с доказан патогенетичен ефект както при развитието, така и при прогресията и хронифицирането на болестта. Досега в научната литература има ограничен обем от изследвания върху наличието и потенциалната роля на автоантитела към други компоненти на комплементната система. Ето защо, дисертационният труд на Галя Михайлова, в който се търсят нови анти-комплементни антитела при пациенти с ЛН и се изучава функционалната им активност, е актуален, а резултатите от него предоставят нова информация за механизмите на развитие на болестта и имат потенциал за прилагане в клиничната практика.

Дисертационният труд е разработен под ръководството на доц. Мария Раданова, дб от Катедра «Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика», МУ-Варна и на д-р Васил Василев, дм от УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София и представлява продължение и разширяване на научното търсене започнато при разработването на дисертационния труд на д-р Василев. Лабораторните анализи в дисертационния труд на Галя Михайлова са изработени в Катедра «Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика», МУ-Варна, като част от направените анализи са проведени в Integrative Cancer Immunology Laboratory на изследователския център Cordeliers Research Center, Париж, Франция в рамките на проект за мобилност, реализирана от докторанта. Изследванията са финансирани по два НИП: единият от ФНИ, МОН в Конкурс за двустранно сътрудничество 2016 г. – България – Франция, а вторият от фонд „Наука“, на МУ-Варна.

2. Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е оформен според стандартите за този вид научни трудове, като са спазени възприетите съотношения на отделните части. Литературният

обзор и резултатите са илюстрирани богато със 7 таблици и 54 фигури, повечето от които имат по няколко фигури. Цитирани са 217 заглавия, три от които на кирилица, а останалите на латиница. Повечето от литературните източници са от последните 10 години.

3. Оценка на литературния обзор

В литературния обзор Галя Михайлова прави стегнат преглед на системата на комплемента като разглежда трите пътя за активиране, както и факторите и механизмите на регулация. Друга централна тема, разглеждана в литературния обзор е ролята на автоантителата срещу компоненти на системата на комплемента при лупусен нефрит (ЛН). Направеният литературен обзор показва задълбочените знания и информираност на докторанта по проблемите, разработвани в дисертационния труд и способността аналитично да интерпретира научните изследвания в областта.

Смятам, че е необходимо при излагането на информация от литературни източници на английски език да се обръща много по-голямо внимание на правилното конструиране на изреченията на български език при превода (*мембран-активиращ комплекс – вместо атакуващ мембраната комплекс; стр. 13, ред 5-7; мембран-кофакторен протеин – вместо мембранен кофакторен протеин; стр. 17, ред 5; стр. 19 – продължаващо значение, имунодиагноза; стр. 20, ред 9 – проследяващи серумни нива и др.*) и да се ограничава използването на чуждици, за които в българския език има подходящи термини и думи/изрази (*инсерира – въвежда, себе-толеранс – толеранс към собствени белтъци; дисрегулация – нарушена регулация; експозирайки – експонирайки или излагайки; детектират – установяват*).

Литературният обзор завършва с кратко заключение, което обаче много точно очертава все още непроучени въпроси, свързани с наличието и ролята на автоантитела към компоненти на комплементната система и дава солидна основа за извеждане на целта и задачите на дисертационния труд. Целта е ясно формулирана, а за постигането и са поставени пет задачи, които са конкретни и много добре дефинирани.

4. Материали и методи

Разделът «Материали и методи» е представен изчерпателно и подробно, като всички разтвори и методи са описани с протоколна точност. Това е показател за личния принос на докторанта в разработването и изпълнението на експериментите.

При разработването на дисертационния си труд Галя Михайлова е овладяла и приложила препаративни методи за изолиране и пречистване на антитела чрез афинитетна хроматография, аналитични методи на базата на ELISA, Western blotting, течна цитометрия (флуоцитометрия, FACS), а за потвърждаване на специфичността на свързване на антителата с техните лиганди (антигени) в реално време е прилагана SPR (surface plasmon resonance) базирана технология, използвайки биосензорен апарат и съответни биосензорни чипове. Приложените методи са напълно адекватни за решаване на поставените задачи и постигане на поставената цел.

Поради факта, че основните използвани аналитични методи са на основата на ELISA, а описаните процедурни стъпки са аналогични, за по-добра яснота и разграничаване на анализите, би било удачно да бъдат представени принципите на описаните анализи.

В проучването са обхванати 81 контролни индивиди и 104 болни с ЛН, които са подходящо подбрани чрез прилагането на конкретни критерии, които са в съответствие с критериите на American College of Rheumatology (ACR) (изпълнени минимум 4 от 11 критерия) и при който е налице лупусен нефрит, доказан хистологично. Препоръчително е още в «Материали и методи» да бъдат представени в таблица демографските характеристики на пациентите и дескриптивния анализ на всички използвани в анализите биомаркери за оценка на активността на лупусната нефропатия,

както и честотата на проява на хистологичните признаци за активност и хроничност на ЛН. Големината на групата на пациентите с ЛН е достатъчна за провеждане на статистическите анализи и за получаване на репрезентативни резултати от тях.

5. Оценка на резултатите, изводите и приносите

Получените резултати включват оригинални данни, представени в раздели, следващи последователността на поставените задачи и са придружени с обобщения на резултатите от съответните експерименти.

Резултати с **оригинален приносен характер** са тези, доказващи наличието и специфичността на автоантитела срещу фактор Р и срещу фактор Н при пациенти с ЛН от българска популация, като е установено, че присъствието на анти-фактор Н автоантитела при пациентите с ЛН не се дължи на генна делеция за фактор Н свързаните протеини (CFHL1, CFHR1 и CFHR2).

Друга група резултати с **оригинален приносен характер с потенциал за приложение в клиничната практика** са получени при анализ на взаимовръзките между нивата на известни биомаркери за оценка на активността на лупусната нефропатия и нивата на новооткритите автоантитела срещу фактор Р и фактор Н. Установени са статистически значими връзки между нивата на анти-фактор Н и анти-фактор Р автоантителата и наличието на седимент в урината (за анти-фактор Н), имунологични параметри за активност - нивата на АНА и на анти-dsDNA антитела и с някои хистологични признаци и индекса за активност. С **потенциално приложно значение** са резултатите показващи, че нивата на анти-фактор Р автоантителата в комбинация с анти-C1q автоантителата повишават специфичността на последните като конвенционален маркер за активност на лупусната нефропатия; а в комбинация с анти-dsDNA антителата имат висока отрицателна предсказваща стойност (NPV).

От функционалните анализи на изолираните от пациентите автоантитела срещу компоненти и регулатори на системата на комплемента (C1r, C1s, C4, C3 и фактор Р), Галя Михайлова **прави предположения за ролята на тези автоантитела в патогенетичните механизми на ЛН**: анти-C1r и анти-C1s антитела нямат функционален ефект върху формирането на C1 комплекса при класическия път на комплементната активация, а анти-фактор Р антителата не повлияват образуването на конвертазата от алтернативния път, но вероятно ускоряват отлагането на C3 върху късни апоптотични клетки, подобно на анти-C3 антителата.

Оригинални са резултатите от проведените *in silico* анализи за **предсказване и визуализиране на епитопи на C3 и C4 компонентите на комплемента и на фактор Р**, които с най-голяма вероятност се разпознават от съответните автоантителата.

В дискусията Галя Михайлова успява компетентно и логично да обвърже собствените си оригинални и потвърдителни резултати с известните от литературата данни. С това Галя показва, че умее да интерпретира собствените си резултати и основавайки се на солидни познания в областта на имунологията да прави коректни научни заключения.

Резултатите от проведените оригинални изследвания са обобщени в 11 основни извода, с чиято формулировка съм напълно съгласна. Приносите за разделени на група от 6 с оригинален характер и 3 с потвърдителен характер. По същество одобрявам приносите, но по отношение на формулировката на принос 2 и 5 от тези с оригинален характер, смятам, че е било по-удачно да се наблегне на установените за първи път взаимовръзки на новоустановените в Българска популация автоантитела с рутинните маркери, а не на факта, че са анализирани за първи път.

Приемам начина, по който е оформен *автореферата*. Той е изготвен като съкратен вариант на дисертацията и включва най-важните резултати и обсъждането им и отразява точно резултатите и фактите в нея.

6. Оценка на публикационната активност

Резултатите от дисертацията са публикувани в 3 научни труда, като един от тях са в списания с ИФ (Общ ИФ=3.532, Q2), вторият е в международно реферирано списание без ИФ и ранк, а третата публикация е в списание на МУ-Варна. Галя Михайлова е подготвила и е подала за рецензиране 2 ръкописа с резултати от дисертацията, но все още не са приети. Резултатите от дисертационния труд са представени още като 6 научни съобщения, 3 от които на международни форуми в чужбина и 3 на форуми в България. Галя Михайлова е първи (представящ) автор на една от публикуваните статии и на всички научни съобщения. Това показва личния и принос в провеждането на изследванията и в подготовката на научните публикации.

7. Критични бележки

Нямам критични бележки по дизайна на работата, изпълнението и описанието на получените резултати. Освен казаните по-горе предложения за корекции и за изчистване стила от чуждици и английски тип словоред, бих си позволила да направя още две предложения:

Фигура 20 Б и анализът, на който тази фигура се основава (Spearman корелационен анализ), смятам, че не са подходящи, защото едната променлива е категорийна само с две групи: пациенти с активен уринен седимент и такива без. Направеният Mann-Whitney U тест е напълно достатъчен за доказване на тезата. Аналогична е ситуацията с фигура 28 Б и корелационния анализ: в този анализ променливата „категория на ЛН според BILAG Renal score“ е категорийна с 4 групи. Проведеният Kruskal-Wallis тест и Mann-Whitney U тест между различните групи са напълно достатъчни.

Показателят за силата на корелационните взаимовръзки при непараметричния корелационен анализ на Spearman не е “r”, а “Rho”. При публикуване на данните в научни статии, този показател трябва да бъде коригиран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за рецензиране дисертационният труд **„Скрининг и функционален анализ на нови анти-комплементни автоантитела в хода на системен лупус еритематодес“** притежава качества на научен труд с висока научна стойност, който съчетава в себе си актуалност на темата, правилен избор на методите на изследване, правилно формулирани изследователски цели и задачи, добре структурирани и представени резултати и оригинални изводи и приноси.

Въз основа на научните достойства на представения дисертационен труд и на представените наукометрични показатели, си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на асистент Галя Михайлова Михайлова научната и образователна степен “Доктор” по научна специалност „Биохимия“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки” Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика

Убедено давам своята **положителна оценка** на проведеното изследване, постигнатите резултати, и научните приноси представени в дисертационния труд, и гласувам с „ДА“ за присъждане на ОНС „доктор“ на асистент Галя Михайлова Михайлова.

01.10.2020.

Член на научно жури.....
/проф. Татяна Влайкова, дб/