

## СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Диана Йорданова Зашева

За дисертационен труд на тема

### **„Влияние на специфични микро РНК-и в туморната патогенеза чрез промяна процесите на автофагия и вродена имунна сигнализация“**

на докторант Радостина Петкова Цветанкова

Лаборатория за репродуктивни ОМИКс технологии

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ към Българска академия на науките

За придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност

Имунология

Шифър: 01.06.23

Становището е изготвено в съответствие с изискванията на закона за развитие на академичния състав на Република България и правилника за приложението му в Институт по биология и имунология на размножаването акад. „Кирил Братанов към Българска академия на науките

Актуалност на научния проблем

Представеният дисертационен труд е посветен на изясняване механизмите на процесите на автофагия и вродена имунна сигнализация под влияние на микро-РНК-и в патогенезата на простатен карцином. Простатният карцином е широко разпространено заболяване и пета причина за смъртност сред мъжете, което прави проблемът социално значим. Изследване на промените на сигналните пътища, свързани с възможности за насочване на клетките към различни механизми на автофагия е особено актуално поради факта, че това заболяване, както и всички карциноми се характеризират с особености, изразяващи се с повишени нива на оксидативен стрес, възпалителни процеси, клетъчно-структурно моделиране, които са ключови за инициране на различни форми на автофагия. От друга страна, търсенето на нови

терапевтични мишени и по-надеждни маркери за диагностициране, както и на изясняване сигналните пътища, свързани с влияние на микро РНК-ите и са особено важни с цел създаване на възможности за индивидуална терапия. Всички гореизброени фактори определят изключителната актуалност и значимост на изследването.

Аргументация на направените в дисертационния труд изследвания

Аргументирана обосновка на изследванията докторантката е направила в обзора на литературните данни, състоящ се от 43 страници. В него авторката е разгледала подробно промените, които настъпват при поява на простатен карцином, механизмите на регулация и промени, свързани с микро РНК-ите в простатната канцерогенеза. Направен е подробен анализ на връзките на процесите на автофагия и апоптоза и сигналните пътища, свързани с тях и имащи отношение към простатен карцином, както и на дуалистичната роля на процеса на автофагия в канцерогенезата. Отделено е специално място на NfκB опосредстваната провъзпалителна сигнализация в патогенезата на карциноми и в частност простатен карцином. Тази аргументация в литературния обзор логично води до обобщението за важността на изясняване на механизмите на въздействие на микро РНК-141, както и изследване на нейното влияние върху процесите на автофагия и на промяна на провъзпалителната сигнализация посредством влиянието на MAPK1 генно заглушаване с цел търсене на нови диагностични и терапевтични таргети на простатния карцином.

### Цел и задачи

Обобщението на литературния обзор логично води до точно и ясно формулиране на целта на дисертационния труд и произтичащите от нея задачи на настоящото изследване.

### Материали и методи

Този дял е описан на 13 страници и включва два раздела: материали и методи. В раздел материали подробно са описани всички необходими материали, химикали и китове, използвани в дисертационния труд. Методите са подробно разписани и възпроизводими. В работата са използвани изключително съвременни методи, в това число трансфекция с РНК-и, PCR анализ в реално време, метилационен анализ, проточна флуоцитометрия, нанопорово

секвениране, флуоресцентна микроскопия, определяне на активности на алкална фосфатаза като репортерен ензим в стабилно трансфектирани с NfkB конструктор клетки, както и редица съвременни методи за статистически анализ.

## Резултати

Раздел резултати са описани на 45 страници и е съставен от 12 дяла, в които са представени 32 фигури, 2 приложения към тях, 3 таблици и една диаграма. Всички представени фигури са с изключително качество. В първата част на резултатите е установено влиянието на трансфектирани с микроRNK141 мимик и инхибитор и РНК инхибитор на MAPK1 гена върху експресията на ATG16L и LC3 (ранен и късен маркери на автофагия) в две простатни карциномни клетъчни линии. РНК14 мимик води до повишена експресия на двата маркера и в двете клетъчни линии, за разлика от заглушаването на MAPK1 гена, който повлиява различно изследваните маркери в двете клетъчни линии, а възпалителният стимул LPS повишава нивата на транскрипция на маркерите на автофагия в андроген резистентната клетъчна линия с метастатичен характер. Установена е повишена макроавтофагия и митофагия и понижени нива на глобалното метилиране в клетъчна линия LnCap. Интерференция на MAPK1 гена повишава проинфламаторната сигнализация на андроген рецептор отрицателната клетъчна линия PC3 и миграцията на двете клетъчни линии, което е по-добре изразено за костно-мозъчната метастатична клетъчна линия. Нанопоровото секвениране на транскриптома на трансфектираната с miRNA141 андроген рецептор отрицателна клетъчна линия PC3 и създадената на тази база диаграма за връзките в сигналните пътища показва обогатяване на TAK1-NfkB и TAK1-p38 MAP киназни сигнални пътища, които се свързват с процеса на автофагия, както и пътища на вроден имунитет, докато инхибирането посредством siRNA141 води до отговор, свързан с неимунни сигнални пътища. Получените резултати изясняват редица молекулни механизми и дават възможност за търсене на нови терапевтични стратегии.

## Дискусия

Дискусията обхваща 20 страници и в нея има две диаграми на генно регулаторни мрежи. Резултатите са обсъдени в светлината на литературните данни от последните години. На базата на построените генно-регулаторни

мрежи е направено обобщение за възможно търсене на нови терапевтични методи за лечение на простатен карцином с конкретен генотип, характерен за РС3 клетъчна линия, след възстановяване на miRNA141 експресията.

Направени са 9 извода, които съответстват на получените резултати.

Въз основа на тях са извадени два приноса с оригинален характер. miRNA141 има доказана роля в регулацията на макроавтофагия, митофагия и предоставя възможност за търсене на терапевтични възможности за метастатични тумори с генетични характеристики на РС3 клетъчна линия. Комбиниране на възстановяване на miRNA141 и селективно инхибиране на MAPK1 гена може да бъде добавъчна стратегия за персонализиран подход на лечение на неподатлив на андроген депривационна терапия простатен карцином.

Имам въпрос към докторантката: На базата на какви аргументи е избрана miRNA141 като възможност за търсене на връзка с процесите, изследвани в дисертацията?

В дисертацията са цитирани 359 литературни източници, по-голямата част от които, от последните години.

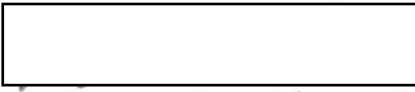
Изследванията са подкрепени финансово от 4 проекта на Лаборатория за репродуктивни ОМИКс технологии.

Данните от дисертационния труд са публикувани в две международни списания с ИФ и са представени на 4 научни мероприятия в чужбина и на едно в страната. Кредитите за изпълнение на докторантската програма са покрити.

В заключение, представеният ми за становище дисертационен труд съдържа резултати, които засягат проблемът, свързан с изясняване молекулни механизми на рак на простатата и дават възможност за търсене на нови подходи за терапия на простатен карцином с генетични характеристики на метастатична клетъчна линия РС3. Това прави работата изключително актуална и социално значима. Докторантката е усвоила редица съвременни методи и е показала умения за анализиране на резултатите, тяхното обобщение и самостоятелно планиране на експериментите. Това ми дава основание да препоръчам убедено на уважаемите членове на научното жури да гласуват положително за присъждане на научната и образователна степен доктор на Радостина Петкова Цветанкова.

17.01.2024 год.

С уважение:

  
/Доц. д-р Диана Зашева/