

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Румяна Цонева

Лаборатория „Трансмембранна сигнализация”

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН

Относно представения дисертационен труд от Александър Емилов Александров, ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ “АКАДЕМИК РУМЕН ЦАНЕВ”, СЕКЦИЯ „РЕГУЛАЦИЯ НА ГЕННАТА АКТИВНОСТ“, по професионално направление 4.3 Биологически науки, специалност Молекулярна биология на тема: **„Синергично индуциране на секреция на извънклетъчни везикули и ДНК от автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти”** за защита.

Представеният дисертационен труд е организиран и представен според приетите национални стандарти и включва: Въведение с цел и задачи – 2 стр.; Литературен обзор- 17 стр.; Материали и методи – 6 стр., Резултати – 25 стр.; Дискусия – 8 стр.; Изводи – 1 стр.; Публикации по темата на дисертацията и участия в конференции – 1 стр., Литературна справка, в която са цитирани 99 източника.

Темата на дисертацията **„Синергично индуциране на секреция на извънклетъчни везикули и ДНК от автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти“** е актуална и напълно дисертабилна според Правилника на ИМБ-БАН за прилагане на ЗРАСРБ. През последното десетилетие извънклетъчните везикули (ИКВ), които се секретират от почти всички видове клетки, привличат вниманието на научната общност поради тяхната разнообразна функция. Освен основна им роля в междуклетъчната комуникация, те участват в имунната регулация, тъканното възстановяване и регенерация, в развитието на различни заболявания (в това число и ракови), както и за освобождаването на клетката от клетъчни отпадъци. Съставът и количеството на секретирани ИКВ силно варира в зависимост от състоянието на клетката, и поради тази причина те могат да служат като диагностични маркери при различни заболявания. Извънклетъчните везикули играят важна роля при развитието на раковите заболявания като модулират туморната микросреда и имунен отговор, участват в процеса на ангиогенеза, и в развитието на резистентност към прилагани терапии. Автофагията е също процес с важно значение при развитието на рака,

макар и двойствено. От една страна тя участва в супресията на туморното развитие, но от друга тя може да стимулира преживяемостта на раковите клетки, което да доведе до резистентност към анти-туморни терапии. Тъй като са налични взаимовръзки/спрегнатост между процесите на биогенеза на ИКВ и тези на автофагия, целта на настоящата дисертация е да се изследва **взаимодействието между автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираното от тях освобождаване на извънклетъчни везикули и извънклетъчни нуклеинови киселини.**

Получените данни биха могли да бъдат използвани, за да се предвиди потенциалната терапевтична роля, както и страничните действия/ефекти при използването на инхибитори на автофагия и ДНК-увреждащи агенти при силно инвазивен мозъчен тумор - глиобластома мултиформе

След кратък и информативен **Увод** запознаващ читателя със същността на поставения проблем, в раздела **Цели и задачи** е формулирана целта на настоящата дисертация, а именно:

Да се изследва взаимодействието между автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираното от тях освобождаване на ИКВ и извънклетъчни нуклеинови киселини

За постигането на тази цел логично са поставени и следните задачи:

1. Анализ на цитотоксичната активност на хлорохин (CHQ) и темозоломид (TMZ) в култури от TMZ-чувствителни (U87-MG) и TMZ-резистентни (U138-MG) клетки
2. Анализ на състава и размерите на секретираните ИКВ при третиране с CHQ и TMZ 3. Потвърждаване на получените резултати при третиране с функционални аналози – Bafilomycin A1 и етопозид
4. Анализ на състава и количеството на секретираните нуклеинови киселини
5. Изследване на количеството увредена ДНК в клетки при комбинирано третиране
6. Изследване на асоциацията на секретираните нуклеинови киселини с ИКВ посредством флоу цитометричен анализ

7. Изследване на инхибирането на автофагия от инхибитори на АТМ (АТМi)
8. Изследване на влиянието на АТМi върху секрецията на ИКВ
9. Изследване на взаимодействието на АТМi с ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираната от тях секреция на ИКВ

Следва стегнат **Литературен обзор**, в който последователно се разглеждат основните понятия и процеси залегнали в дисертацията:

1. **Извънклетъчни везикули** - направен е преглед на функциите, класификацията им по размери, биогенезата и екскрецията им. Обърнато е внимание на значението им при развитие на раковите заболявания. Описани са основните характеристики на маркерите на извънклетъчни везикули, които се изследват в настоящата дисертация като CD63, Syntenin-1, ALIX и Caveolin-1.
2. **Автофагия**– Описани са три основни вида автофагия и ролята им при доставка и разграждане на клетъчен материал. Макрофагията е описана по-подробно, като това включва формиране на специализирани мембранни структури, активиране на каскада от автофагични протеини, привличане на подлежащия на автофагия товар и неговото разграждане в лизозомите. Основно внимание е обърнато на ролята на автофагията при раковите заболявания и двойствения ѝ характер, което обуславя и две терапевтични стратегии – активиране и инхибиране. С втората стратегия на инхибиране на автофагията при ракови заболявания са разгледани и механизма на действие на два нейни инхибитора - хлорохин (CHQ) и Bafilomycin A1. Спомената е и секреторната автофагия.
3. **Взаимовръзка между биогенезата на извънклетъчни везикули и автофагията**– Обърнато е особено внимание на взаимовръзката на тези два допълващи се процеси за елиминиране на вредни или излишни вещества от клетката и поддържане на клетъчната хомеостаза. В зависимост от състоянието на клетката съдържанието на амфизомите (хибридни органели получени от сливането на автофагозони и мултивезикуларни тела) може да бъде разградено от лизозомите и ли да бъде екскретирано извън клетката. Между тези два процеса съществува равновесие и ако един от тях се инхибира или е дефектен, съответно другият може да се засили.

4. **Мултиформен глиобластом** – разгледани са основните черти и прилаганата терапия за този високо-агресивен мозъчен тумор. Отчетена е ролята на автофагията в прогресията на заболяването и развитие на резистентност към приложената терапия. Подчертана е взаимовръзката между автофагия и секрецията на ИКВ, както и нейното модулиране при прилагане на инхибитори на късна автофагия като хлорохин и Bafilomycin A1.
5. **АТМ киназа и АТМ инхибитори** – описани са предимствата на терапевтични стратегии за борба с рака чрез използване на инхибитори на ензими участващи в поправката на ДНК, и комбиниране с генотоксични агенти и прилагане на радиация. Описана е функцията на ензима ataxia-telangiectasia mutated (АТМ), който участва като тумор супресор активирайки арест на клетъчния цикъл и апоптоза, но в същевременно може да подпомага оцеляването на ракови клетки чрез стимулиране на резистентността им към ДНК увреждания. Описани са два АТМ инхибитора използвани в настоящата дисертация (KU-55933 и KU-60019), които значително подобряват токсичността на индуктори на двойноверижни скъсвания. Има данни за инхибиране на автофагията по различен механизъм от тези АТМ инхибитори, което ги прави интересен обект за проучване на влиянието им върху секрецията на ИКВ.

Литературният обзор е добре структуриран, като авторът компетентно описва съвременните изследвания в областта. Въпреки това, липсва известна задълбоченост, изчерпателност и взаимосвързаност на изнесените научни данни, за да могат да се формулират хипотези и да се определи значимостта на предлаганото изследване. Информацията за секреторната автофагия е доста оскъдна, независимо от потенциалната ѝ свързаност със секрецията на ИКВ. Добавяне на информация касаеща имуномодулаторния и невропротективен ефект на използваните инхибитори би обогатило и дало допълнителна дълбочина на предвидените изследвания. В обзора са включени 6 информативни фигури, като обаче част от тях не са с високо качество и не са добре форматираны в текста.

В частта **Материали и методи** са описани коректно и подробно използваните материали като клетъчни линии, общи реагенти и антитела. Използваните методики, като анализ на клетъчна преживяемост, изолиране на ИКВ, имуноблот, DLS (Dynamic Light Scattering) анализ, флуоресцентна микроскопия, анализ на извънклетъчни нуклеинови киселини, кометен анализ, са описани прецизно.

Разделът **Резултати** включва:

- I. Анализ на цитотоксична активност, състав, размер и нива на секреция на ИКВ от глиобластомни клетки под въздействието на инхибитори на автофагия и химиотерапевтици**
 - **Анализ на цитотоксична активност на хлорохин (CHQ) и темозоломид (TMZ) в култури от TMZ-чувствителни (U87-MG) и TMZ-резистентни (U138-MG) клетки**

В проучването са използвани TMZ-чувствителни (U87-MG) и TMZ – резистентни (U138-MG) глиобластомни клетъчни линии, за да се установят потенциалните взаимодействия между TMZ и CHQ при секреция на ИКВ. Сравнен е ефекта на 10 μ M CHQ върху цитотоксичността на 400 μ M TMZ към U87-MG и U138-MG клетъчни култури след 48 часова инкубация в среда с 5% серум, пречистен от ИКВ. Установен е ефект на сенсibiliзиране от третирането с CHQ към цитотоксичния ефект на TMZ само към TMZ – резистентна (U138-MG) глиобластомна клетъчна линия.

- **Анализ на състава и размерите на секретирани ИКВ при третиране с CHQ и TMZ глиобластомни клетъчни линии**

При изследване на размера на ИКВ секретирани от U87-MG глиобластомни клетки (TMZ-чувствителни) третиран с TMZ и CHQ (поотделно и в комбинация) чрез DLS анализ, само проби от клетки, третиран с TMZ и CHQ показват измерими резултати. Установяват се ИКВ с размери 50 до 150 (малки ИКВ) и с размери 150-500 nm (големи ИКВ). При комбинираното третиране автофагичните (LC3B-II и p62) и екзозомните маркери (alix, syntenin-1 и CD63) са значителни повишени съответно в големи и малки ИКВ. Caveolin-1 е засечен във всички проби от големи ИКВ, като е синергично увеличен от комбинацията TMZ+CHQ. В клетъчните лизати комбинираното третиране води също до повишаване на автофагичните маркери p62 и LC3B-II.

При U138-MG (TMZ – резистентни) глиобластомни клетки се наблюдава също синергичен ефект от комбинираното третиране по отношение на нивата на LC3B-II и p62 във фракцията

от големи ИКВ, както и кавеолин в тази на малки ИКВ. Същите маркери са значително завишени и в клетъчни лизати.

В допълнение, е показано че CHQ третирането на U87-MG глиобластомни клетки (TMZ-чувствителни) индуцира натрупване на LC3B в лумена на CD63 позитивни амфизоми/автолизозоми и LC3B - caveolin-1 колокализация в тези структури.

- **Потвърждаване на получените резултати при третиране с функционални аналози – Bafilomycin A1 и етопозид**

Подобно на CHQ, третиране на U87-MG клетки с 50nM **BafA1** индуцира секреция на големи ИКВ, съдържащи LC3B-II, p62, CD63 и caveolin-1, като тези маркери са увеличени значително при добавяне на TMZ. Комбинираното третиране с BafA1 и TMZ значително покачва цитотоксичността. Добавянето на Brefeldin A (BFA) -инхибитор на вътреклетъчния везикуларен транспорт и секреция на ИКВ, не води до изменение в секрецията на ИКВ от U87-MG клетки.

За да се установи потенциално синергично действие на CHQ с други генотоксични агенти по отношение на повишена секреция на ИКВ, е направен експеримент с **етопозид** (химиотерапевтик, индуциращ увреждане на ДНК чрез инхибиране на топоизомеразата II). Резултатите сочат, че подобно на TMZ, етопозидът значително повишава индуцираната от CHQ секреция на автофагични маркери от U87-MG клетки.

II. Анализ на увредена ДНК в клетки, състава и количеството на секретираните нуклеинови киселини и тяхната асоциация с ИКВ

- **Изследване на количеството увредена ДНК в клетки при комбинирано третиране**

Установено е, че CHQ в комбинация с TMZ значително повишава нивата на уН2АХ при третиране на U87-MG клетки. Същевременно не се наблюдава директно увеличаване на количеството на увредена ДНК в клетките.

- **Изследване на асоцииране на секретираните нуклеинови киселини с ИКВ посредством флоу цитометричен анализ**

Установено е, че CHQ и TMZ синергично индуцират секреция на извънклетъчни нуклеинови киселини в култури от U87-MG клетки. Пробите съдържат молекули с размери от 200 до 20 000 базови двойки отговаряйки на смес от едноверижна ДНК, двуверижна ДНК и РНК.

Посредством флоуцитометрия е изследвано асоциирането на секретирани нуклеинови киселини с ИКВ. Комбинираното третиране с CHQ и TMZ на U87-MG клетки води до увеличена секреция на ИКВ с асоциирани НК.

Получените данни от тези подраздели потвърждават хипотезата, че увреждане на ДНК (чрез TMZ и етопозид) в комбинация с лизозомно инхибиране (CHQ и BafA1) води до синергично усилена цитотоксичност и секреция на ИКВ и НК.

III. Изследване на влиянието на инхибитори на АТМ, самостоятелно и в комбинация с ДНК-увреждащи агенти, върху автофагията и секрецията на ИКВ

- Изследване на инхибирането на автофагия от инхибитори на АТМ (АТМi)**

Използването на два селективни инхибитора на АТМ (KU-55933 и KU-60019) показва дозо-зависимо натрупване на LC3B-II и p62 в HeLa Kyoto клетки в зоната на автофагозоми или автолизозоми. При отсъствие на серум KU-60019 предизвиква ко-локализация на маркера за автофагия LC3B и лизозомния маркер LAMP1.

- Изследване на влиянието на АТМi върху секрецията на ИКВ**

Установено е, че KU-60019 индуцира дозо-зависима секреция на малки и големи ИКВ, съдържащи автофагични маркери (LC3B-II и p62), както и класически ИКВ маркери (syntenin и CD63). Наличието на caveolin-1, е установено само в големи ИКВ секретирани от HeLa Kyoto клетки третирани с KU-55933

- Изследване на взаимодействието на АТМi с ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираната от тях секреция на ИКВ**

Комбинираното третиране на HeLa Kyoto клетки с KU-60019 и етопозид води до значителна секреция на p62 и CD63 в големи ИКВ, както и LC3B-II, syntenin, CD63 и извънклетъчна ДНК във фракцията от малки ИКВ.

В раздел **Дискусия** се дискутират основните въпроси поставени в дисертацията:

- ✓ Синергичният ефект на прилаганите ДНК-увреждащи агенти и автофагични инхибитори върху индуциране на секрецията на ИКВ и НК се проявява независимо от конкретно прилаганите ДНК-увреждащи агенти, както от прилаганите инхибитори на късна автофагия (хлорохин или бафиломицин) или АТМ инхибитори. Това предполага, че наблюдаваният ефект се проявява универсално при увреждане на ДНК и инхибиране на късна автофагия, или автофагия като цяло.
- ✓ Индуцираната активна секреция на ИКВ не е предизикана от високи нива на апоптоза и освобождаване на апоптотични телца. Основание за това са липсата на цитохром С1 – маркер в ИКВ проби.
- ✓ Колокализацията на LAMP1 с най-интензивните фокуси от LC3 в перифериите на клетки третирани с KU-60019 предполага, че възможния механизъм за инхибиране на автофагията е вероятното инхибиране на формирането на автолизозоми.
- ✓ АТМ инхибиторите индуцират секреция на ИКВ от HeLa клетки, позитивни за LC3B-II и p62, което доказва техния автофагозомен произход.
- ✓ Индуцираната от KU-60019 акумулация на p62 (автофагичен маркер) е вероятния механизъм за възпрепятстване поправката на ДНК.

В обобщение, темата на настоящия дисертационен труд е насочена към изясняване на ролята на автофагията и възможните механизми участващи в секрецията на извънклетъчни везикули и нуклеинови киселини при третиране на ракови клетки с ДНК-увреждащи агенти, инхибитори на автофагията и АТМ.

Направените **Изводи** са адекватни и изчерпателни. Акцентираща се на синергично индуцираната секреция на ИКВ и НК от автофагозомен инхибитор и ДНК-увреждащи агенти, която не корелира с проапоптотична активност на комбинираното третиране.

Синергичната секреция на ИКВ и НК вероятно се дължи на ДНК увреждане на фона на лизозомно инхибиране. АТМ инхибиторите подтискат автофагията на късен етап индуцирайки секреция на ИКВ и ДНК. АТМ инхибиторите в синергизъм с етопозид усилват секрецията на ИКВ и НК. Наличието на caveolin-1 в секретирани ИКВ подчертава техния възможен патологичен потенциал при подпомагане на туморното метастазиране.

Би било много полезно в бъдеще да се изясни ефекта на увеличената секреция на ИКВ от ракови клетки върху процеса на ангиогенеза и имунен отговор.

В дисертацията следват списък на **Публикации във връзка с дисертационния труд и Участия в научни конференции и семинари**. От изложените списъци е видно, че резултатите от дисертационния труд са публикувани в две статии с импакт фактор (като и в двете докторантът е първи автор) и са представени на национални и международни конференции.

Дисертацията завършва със списък на използваната литература, като прави впечатление, че са използвани съвсем нови заглавия включващи актуални изследвания по темата на дисертацията.

От прегледа на представения материал се вижда, че е извършена значителна по обем и качество научно-изследователска работа и той напълно отговаря на изискванията на Закона за научните степени и звания за допускане на докторанта Александър Емилов Александров до защита за придобиване на научно-образователната степен „ДОКТОР“.

Въпрос към докторанта: Каква може да е потенциалната патологична роля на caveolin-1 в секретирани ИКВ от ракови клетки?

14.07.2026 г.

Проф. д-р Румяна Цонева

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН