

СТАНОВИЩЕ

от проф., д-р Румяна Димитрова Цонева

Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“, ИБФБМИ-БАН

относно дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен "доктор" по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Молекулярна биология"

на Десислава Валериева Владимирова, докторант към Секция „Структура и функция на хроматина“, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН

Тема на дисертационния труд: „Роля на HMGB1 в епително-мезенхимния процес (EMT) и метастазирането в 2D и 3D модели на рак на млечната жлеза“

1. Актуалност на тематиката

Научният интерес към молекулярните механизми на метастатичния процес на клетки от рак на гърдата, който е в основната причина на леталните случаи на пациентки с тази диагноза, се обуславя от високата заболяемост на жени в активна възраст и представлява освен здравен, но и социално-икономически проблем.

Нарастващия интерес от страна на фармацевтичната промишленост за разработване на по-ефективни насочени терапевтични стратегии обяснява и необходимостта от изучаване на процесите на метастазирането, в което епително-мезенхимния клетъчен преход играе ключова роля.

Темата на дисертационния труд, която е насочена към разкриване на ролята на белтъка HMGB1 и негови модификации в молекулярните механизми на епително-мезенхимния преход при клетъчни линии от рак на млечна жлеза с различен метастатичен потенциал, както и влиянието на антидиабетичния медикамент метформин за потискане на метастазирането, е актуална и напълно отговаря на научната специалност.

2. Познаване състоянието на проблема

Настоящият дисертационен труд се състои от 169 страници и е организиран и представен според приетите стандарти. Цитирани са 238 научни труда, като значителна част от тях са от последните 10 години. Литературният обзор включва преглед на факторите обуславящи възникването на рака като заболяване, разпространението му по демографски групи, както и патогенезата, класификация и стадиране на рака на млечната жлеза. Подробно е описано молекулярната класификация на този вид рак включващ наличието или отсъствие на различни рецептори за хормони и растежни фактори и пролиферативна активност. Широко е застъпена ролята на HMGB1 в активиране на EMT в прогресията на рака на млечната жлеза в контекста на туморогенезата и терапевтичните стратегии.

Като цяло литературният обзор е задълбочен, много добре структуриран и изчерпателен, което е атестация за добро боравене със съвременната информация отразяваща изследванията в тази област. За по-голямо онагледяване в обзора са представени 16 фигури 1 таблица.

3. Цел, задачи и методология на изследването

Целите на настоящия дисертационен труд са ясно формулирани: 1.) Да се сравни ефектът на HMGB1 и HMGB1ΔC върху активирането на EMT, клетъчна миграция и инвазия в различни подтипове на рак на млечната жлеза (включваща 5 подзадачи); и 2.) Да се оцени потенциалът на метформин като терапевтичен модулатор на HMGB1-зависимия EMT (включваща 5 подзадачи).

В частта “Материали и методи” са описани коректно и подробно използваните многобройни клетъчни, биохимични, имунологични и молекулярни методи, както следва: експресия и пречистване на рекомбинантни белтъци HMGB1 и HMGB1ΔC; оцветяване на клетки с DAPI; метод на „зарастване на рана“; формиране на 3D туморни сфероиди; оценяване на клетъчна жизнеспособност с MTT тест или Calcein-AM и пропидиев йодид (PI); SDS-PAGE и Western blot; субклетъчно фракциониране; заглушаване на рецептора RAGE; имунофлуоресценция; имунопреципитация и др.

4. Оценка на получените резултати и тяхната интерпретация

В раздели "Резултати“, „Дискусия" и „Заклучение“ (58 стр.) задълбочено са коментирани получените резултати касаещи влиянието на предварително пречистени и верифицирани

рекомбинантни белтъци (HMGB1 и HMGB1ΔC) върху клетъчната миграция на клетки от рак на гърдата с различен метастатичен потенциал; върху експресията на EMT-маркери като N-cadherin и E-cadherin, Vimentin и ZO-1; както и базовата експресия на HMGB1 и RAGE, NF-κB и NF-κB - phospho-p65 от раковите клетки и неракови епителни клетки от млечна жлеза. В допълнение е оценена ролята на HMGB1 и HMGB1ΔC за транслокацията на фосфорилиран NF-κB в ядрото на MDA-MB-231 клетки. С цел създаване на триизмерни клетъчни сфероиди е изследвано количеството на метилцелулоза, клетъчна плътност и тяхната жизнеспособност. В последващи изследвания е оценен и анализиран ефекта на рекомбинантните белтъци върху инвазивния потенциал на 3D сфероиди от MDA-MB-231 в колаген тип I матрикс. Последва анализ на ролята на рецептор RAGE за миграцията и инвазията на MDA-MB-231 клетки след третиране с рекомбинантните белтъци HMGB1 и HMGB1ΔC, както и техният ефект върху експресията на виментин след заглушаване на рецептор RAGE. Подробно е анализирано влиянието на метформин върху клетъчната миграция, инвазия, експресията на EMT-маркери и транслокацията на фосфорилиран NF-κB в ядрото на MDA-MB-231 клетки както самостоятелно, така и в комбинация с рекомбинантните белтъци. Чрез използване на ко-имунопреципитационен анализ е изследван ефекта на метформин върху взаимодействието HMGB1/RAGE при MDA-MB-231 клетки.

На базата на проведените експерименти бяха формулирани три извода определящи клетъчно-специфичността на активацията на EMT, като двата рекомбинанти белтъка индуцират EMT по RAGE-зависим и RAGE-независим начин; метформина намалява клетъчната подвижност, инвазия, активиране на NF-κB и EMT чрез предотвратяване на взаимодействието HMGB1- RAGE,

Много добро впечатление прави глава „Заклучение“ където кратко и систематично са изредени главните акценти на настоящето изследване включено в дисертацията, а включените глави „Ограничения на изследването“ и „Бъдещи научни перспективи“ придават допълнителна критичност и перспективност на научната работата.

5. Оценка на приносите на дисертационния труд

Посочените **Приноси** са адекватни и изчерпателни. Изведените 5 приноса обобщават най-важните резултати на дисертационния труд, като се акцентира върху клетъчно-

специфичното действие на HMGB1 и HMGB1ΔC в прогресията на рак на млечната жлеза и възможността за използването на метформин като терапевтичен модулатор на HMGB1-медираната ЕМТ инвазия.

6. Личен принос на докторанта и публикации

Във връзка с дисертационния труд са публикувани четири статии с импакт фактор, в три от които Десислава Владимирова е водещ автор, което недвусмислено показва високия личен принос на докторантката. Резултатите от дисертацията са представени на три научни форума.

Заклучение:

Представеният от **Десислава Валериева Владимирова** дисертационен труд представя едно актуално и оригинално проучване свързано с ролята и механизма на действие на белтъка HMGB1 върху миграционния капацитет и ЕМТ на клетки от рак на млечната жлеза, както и влиянието на антидиабетичния медикамент метформин върху миграционния и инвазивния им потенциал. Докторантката показва владение на голям набор от методики и отличен усет за анализиране и обобщаване на получените резултати. Дисертацията, както и придружаващите я документи напълно отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, правилниците на БАН и ИМБ за неговото приложение.

Като взимам под внимание всичко изредено по-горе, убедено гласувам положително и препоръчвам на почитаемото Научно жури да подкрепи присъждането на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Молекулярна биология" на докторант Десислава Валериева Владимирова.

Въпрос към докторантката: Как бихте оценили влиянието на HMGB1 в ремоделирането на белтъците от извънклетъчния матрикс в процеса на метастазиране в контекста неговото инхибиране?

20.01.2025 г.

София

Изготвил становището:

(проф. д-р Румяна Димитрова Цонева)