



РЕЦЕНЗИЯ

от професор Диана Георгиева Иванова, доктор на биологическите науки,
декан на Факултета по фармация
при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна

на дисертационен труд на д-р Таня Тачева Тачева от Катедрата по химия и биохимия при Факултета по медицина на Тракийски университет – Стара Загора, на тема: „ГЕНЕТИЧНИ И КЛЕТЪЧНИ ФАКТОРИ ПРИ ХОББ И БРОНХИАЛНА АСТМА – СПЕЦИЛНО ВНИМАНИЕ ВЪРХУ РОЛЯТА НА ПРОТЕАЗИ И АНТИПРОТЕАЗИ“, представен за присъждане на научната степен „Доктор“ по научна специалност „Биохимия“.

1. Актуалност на дисертационния труд

Хроничната обструктивна белодробна болест (ХОББ) и бронхиалната астма (БА) са хронични възпалителни заболявания на белите дробове, които се дължат на възпалителна реакция на дихателните пътища към различни фактори на околната среда. Точният механизъм на развитието на ХОББ не е напълно изяснен, но тютюнопушенето и други етиологични фактори, както и разнообразие от генетични фактори се приемат за предразполагащи механизми за това заболяване. БА се развива като хронично неинфекциозно (най-често алергично) възпаление на дихателните пътища, с участието на много клетки и цитокини. И двете са комплексни многофакторни заболявания, за развитието на които роля имат както екзогенни фактори на средата така и разнообразие от генетични фактори.

Поради високата социална значимост и на двете заболявания през последните години се наблюдава повишен интерес към проучване на генетичните фактори, въввлечени в предиспозицията към бронхиална астма и ХОББ. Белодробното възпаление, окислителния стрес и ремоделирането на стените на въздухоносните пътища заемат основно място в патогенезата на тези заболявания. Окислителният стрес има много ефекти, в т.ч. инактивиране на антипротеази и активиране на metalloпротеинази от оксиданти, водещо до дисбаланс на протеази и антипротеази в белия дроб, който е в основата на патогенезата на емфизема. Установено е, че повечето гени, кодиращи матриксните metalloпротеинази (ММР) са високо полиморфни, като са описани множество функционални полиморфизми, асоциирани с променена генна експресия и/или ензимна активност, които на свой ред могат да повлияват развитието и прогресията на различни патологични състояния, включително БА и ХОББ. В този аспект проучванията, представени в настоящия дисертационен труд, са посветени на един актуален научен проблем.

2. Структура на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд обхваща 141 страници и е структуриран както следва: литературен обзор и изводи – 32 страници, цели и задачи – 1 страница, материали и методи – 11 страници, резултати 38 страници и обсъждане – 22 страници, изводи – 1 страница, приноси – 1 страница, библиография – 25 страници, списък на публикации и участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд – 3 страници. Онагледен е с 30 таблици и 43 фигури.

3. Литературна и методологична обезпеченост

Литературният обзор представя подробно в две отделни части етиологията, клиничните признаци и морфологичните промени, диагнозата и рисковите фактори, патофизиологията и патогенезата на ХОББ и БА, като подробно се разглеждат молекулните механизми на заболяванията, ролята на оксидативния стрес, на протеазния/антипротеазен дисбаланс, участващите цитокини и растежни фактори, както и ролята на стареенето. Отделна част представя ролята на протеиназите и антипротеиназите при ХОББ и БА: в детайли се разглежда значението и α 1-Антитрипсин, неутрофилни серинови протеинази, ADAM, матриксни металопроотеинази. Една от основните хипотези за развитието на ХОББ (и БА) е дисбалансът между протеази и антипротеази. Според тази хипотеза понижената концентрация на антипротеази или повишения синтез на протеази води до увреждане на паренхима на белия дроб. От друга страна, свръхпродукцията на инхибитори на протеазите, или пониженият синтез на последните, при БА, може да предизвика задебеляване на стените и обструкция на дихателните пътища. Намирам за много интересна и изчерпателно подробна тази част от литературния обзор, която представя структурата, класификацията, механизмите на действие и активирането на MMP, техните ендогенни инхибитори (TIMP) и полиморфизмите в гените за MMP, поставяйки така една добра основа за анализа и обсъждането на резултатите. В допълнение, литературният обзор включва илюстративен материал от 4 фигури и една таблица, които много добре онагледяват обобщенията на литературните данни и достиженията в областта, като улесняват читателя и плавно и логично го въвеждат в научната проблематика. Литературният обзор завършва с изводи, които логично обосновават поставените цели и задачи.

Библиографията включва 377 литературни източника, от които 1 на кирилица. От цитираните литературни източници основната част са от последните години.

Научната разработка е осъществена на базата на биологичен материал от голяма представителна група от 204 пациенти с ХОББ, 89 пациенти с Бронхиална астма (от тях 26 деца, под 18 г. и 63 възрастни, над 18 г.) и 412 незасегнати от заболяванията индивиди.

Представените в дисертационния труд резултати са получени и анализирани при умелото използване на богат набор от съвременни молекулярно-биологични методи, които са много добро постижение за дисертанта. Материалите и методите са адекватно подбрани, за да се постигнат целите и задачите на проучването. Методите са представени информативно и ясно в раздела „Материали и методи“, с включване на таблица с клинични и демографски характеристики на пациентите и контролните индивиди, участващи в изследванията. Подробно са представени подходите за генотипиране по отделните еднонуклеотидни полиморфизми (PCR-RFLP-базиран метод или количествен Real-time PCR), използваните при всеки анализ праймери и условия на провеждане на амплификационните и рестриктазни реакции, анализът. Използването на метод за определяне дължината на теломерите в левкоцити от цяла кръв (SYBR green-базиран qPCR метод), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) методи за определяне на концентрацията на различни MMP в серум и на TIMP-2 в плазма, допълва богатата палитра от молекулярно-биологични анализи, овладяни от докторантката. Представените в подробности отделни методики ги прави лесно възпроизводими.

Данните от всички експерименти са подходящо обработени статистически с прилагането на пакет от статистически програми за Windows, StatView™ версия 4.53 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, California, USA), и посредством компетентното прилагане на съответните статистически анализи: дескриптивен анализ, алтернативен анализ, непараметрични анализи (Хи квадрат тест и U-тест на Mann-Whitney и Kruskal-Wallis тест), вариационен анализ, изчисляване на генотипни и алелни честоти, анализ на съответствията (закон на Харди-Вайнберг), корелационни анализи, логистичен регресионен анализ.

4. Резултати и обсъждане

Получените резултати включват голям брой от оригинални данни, представени в съответствие с поставените задачи. В настоящия дисертационен труд са изследвани пет основни матриксни металопроотеинази: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 и MMP-12. От установените досега полиморфизми в гените на тези цитокини са изследвани промоторните полиморфизми MMP1 -1607insG (1G>2G, rs1799750), MMP2 -1306 C>T

(rs243865), MMP3 -1171insA (5A>6A, rs3025058), MMP7 -181A>G (rs11568818) и MMP12 -82 A>G (rs2276109), за които има *in vitro* данни за функционални ефекти върху степента на експресия на съответните генни продукти (ензимни молекули). Измерени са също така концентрациите в серум/плазма на изследваните ензими, с изключение на MMP-12. В допълнение, концентрацията на един от специфичните ендogenous инхибитори на MMP (TIMP2) е също измерена. От контролната група, включваща 412 индивида от Старозагорски регион, по отношение на MMP1 -1607insG промоторния полиморфизъм са изследвани 172 индивида.

Резултатите от проучването са свързани с установяване на алелните и генотипни честоти по отношение на промоторните полиморфизми MMP1 -1607insG (rs1799750), MMP2 - 1306 C>T(rs243865), MMP3 -1171insA (rs3025058), MMP7 -181A>G (rs11568818), MMP12 - 82 A>G (rs2276109), TERC C>G (rs12696304) и TERC C>T (rs10936599) при Българска контролна група от индивиди от регион Стара Загора. Намерените генотипни разпределения по отношение на полиморфизмите в MMP3, MMP7 и TERC C>G кореспондират с резултатите за други популации от Кавказки тип.

По отношение на предиктивния капацитет на изследваните полиморфизми, от значение е че носителите на T-съдържащи генотипове (CT+TT) на MMP2 -1306C>T полиморфизма може да имат по-висок риск (1.64 пъти) от развитие на ХОББ, особено в напреднала възраст и че плазмената концентрация на TIMP-2 е статистически значимо по-ниска, а съотношението MMP-2/TIMP-2 по-високо при пациенти с ХОББ в сравнение с контролните индивиди. Високопродуциращият 5A алел на промоторния полиморфизъм -1171insA (5A>6A) в MMP3 се явява протектиращ при развитието на БА, но не се асоциира с развитието на ХОББ. Серумни нива на MMP-3 могат да бъдат използвани като показател за ХОББ и БА при възрастни, но не при деца с БА. MMP7 -181A>G промоторният полиморфизъм се асоциира с риска от развитие на ХОББ, като генотиповете съдържащи вариантния G алел (AG+GG), могат да се смятат за предразполагащи за развитието на заболяването. Установено бе, че вариантният G алел, както и G-съдържащите генотипове на MMP12 -82 A>G промоторния полиморфизъм, се срещат по-често в контролната група отколкото при пациентите с ХОББ и с БА, което определя 2 пъти по-малък риск от развитие на ХОББ и 4.2 пъти по-малък риск от развитие на БА при носителство на тези генотипи.

В изследваните групи се установява статистически незначимо по-къси теломери при пациентите с ХОББ и по-висока честота на дивия-тип алели. Тези резултати водят

до заключението, че генотиповете, съдържащи вариантен алел (rs12696304 CG+GG и rs10936599 CT+TT), се явяват протективни и дължината на теломерите най-вероятно е повлияна от други фактори. Според представеното проучване левкоцитните теломери са по-къси при пациенти с ХОББ, независимо от генотипа. Може би други фактори, които играят роля в развитието на заболяването (хронично възпаление и оксидативен стрес) влияят върху дължината на теломерите.

Изводите са конкретни и отразяват точно получените резултати и тяхното значение. От особено значение е, че значителна част от изследванията са пионерни за България, а някои представляват принос в световната литература.

Приносите на настоящата дисертация са ясно формулирани и могат да бъдат приети без забележки. Някои от съществените приноси на дисертационния труд, които имат не само теоретична, но и приложно-научна стойност са:

- За първи път в България е проведено популационно изследване за определяне на генотипни и алелни честоти по отношение на промоторните полиморфизми MMP1 -1607insG, MMP2 - 1306 C>T, MMP3 -1171insA, MMP7 -181A>G, MMP12 - 82 A>G, TERC C>G и TERC C>T.
- Оригинален е приносът за доказване протективната роля на 5A алела на MMP3 (-1171insA, 5A>6A) промоторния полиморфизъм за развитието на БА. Потвърдено е, че този полиморфизъм не повлиява развитието на ХОББ.
- Потвърдено бе, че за разлика от *in vitro* изследванията, при пациенти 6A/6A на MMP3 -1171insA генотипът се асоциира със значително по-високи нива на ензима в серума.
- Установено бе, че носителството на поне един вариантен T алел (CT+TT) на MMP2 -1306C>T полиморфизма, се явява рисков фактор за развитието на ХОББ, като за първи път това предразположение се доказва при напреднала възраст.
- Оригинален принос е доказаната роля на вариантния G алел (AG+GG) на MMP7 -181A>G промоторния полиморфизъм за риска от ХОББ в по-млада възраст. Оригинален принос е установеният протективен ефект за развитието на ХОББ на генотиповете съдържащи вариантен G алел (CG+GG) на полиморфизма TERC C>G (rs12696304).

- Измерени са концентрациите в кръв на няколко матриксни металопротеинази и е установена ролята на MMP-3 и MMP-2/TIMP-2 съотношението като биомаркери при ХОББ и на MMP-3 при възрастни пациенти с БА.

Във връзка с дисертационния труд е представен списък от 4 публикации в пълен текст в медицински списания, на които д-р Таня Тачева е първи автор. Две от публикациите са в списания с импакт фактор. Резултатите са докладвани на 13 международни научни форума, 9 от които в чужбина. На 11 от научните съобщения дисертантката е първи автор, което недвусмислено показва нейния основен принос в разработките. Считам, че работата е добре представена и популяризирана пред научната общност, включително и периодично обсъждана на Националните научни срещи по биохимия, където основни части от нея са докладвани и дискутирани.

Оценката ми за представената дисертация е изцяло положителна.

Декларирам, че нямам общи публикации с дисертанта.

5. Заключение

Дисертационният труд на д-р Таня Тачева, озаглавен “ГЕНЕТИЧНИ И КЛЕТЪЧНИ ФАКТОРИ ПРИ ХОББ И БРОНХИАЛНА АСТМА – СПЕЦИЛНО ВНИМАНИЕ ВЪРХУ РОЛЯТА НА ПРОТЕАЗИ И АНТИПРОТЕАЗИ” е широкообхватно проучване, при което са получени оригинални данни за генотипните разпределения в Българската популация по отношение на еднонуклеотидни полиморфизми при гени, изследвани като рискови фактори за развитието на ХОББ и БА. Дисертантката има добра теоретична и висока методологична подготовка, умело прилага съвременни молекулярно-биологични подходи. Считам, че настоящият дисертационен труд напълно отговаря на изискванията за съответната научна степен, формулирани от Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за развитието на академичния състав в Тракийски университет – Стара Загора. Давам висока положителна оценка и предлагам на научното жури да присъди научната степен „Доктор” по научна специалност „Биохимия” на ас. Таня Танчева.

12.09. 2017 г.

Рецензент:



/Проф. Диана Георгиева Иванова, дбн/