

СТАНОВИЩЕ

от acad. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

относно дисертационния труд на Силвия Георгиева Календерова – Вълкова

представен за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност „Биохимия“

Имам честта да представя дисертационния труд на Силвия Георгиева Календерова – Вълкова на тема „Роля на Ca^{2+} /калмодулин зависимата протеин киназа II в пролиферацията и апоптозата на нормални и малигнени човешки епидермални кератиноцити“, изработена под мое ръководство в Катедра „Медицинска химия и биохимия“, Лаборатория по клетъчна сигнализация. Дисертацията е написана на 108 страници и съдържа 14 фигури, 3 таблици и 256 литературни източници. Научната работа, описана в дисертационния труд, обхваща изследвания върху ключов компонент от клетъчната сигнализация, а именно Ca^{2+} /калмодулин зависимата протеин киназа II (CaMK II) и нейната важна роля в провеждането на сигнали, инициирани от промяна в концентрацията на Ca^{2+} йони.

За целите на своите изследвания докторантката избира ценната моделна система на пролифериращи базални кератиноцити от човешки епидермис. Култивирани в автокринни условия, тези клетки поддържат автономен растеж и пролиферация, което дава уникалната възможност да се изследва ролята на ключови сигнални молекули, регулиращи клетъчния цикъл, като се минимализира влиянието на външни фактори. Още повече, до момента CaMK II сигналната каскада не е проучвана в епидермални клетки. За проучванията на ролята на CaMK II в контрола на програмираната клетъчна смърт, Силвия Календерова избира обезсмъртената кератиноцитна линия A431, която е удобна алтернатива на скъпата и трудоемка за поддържане култура от нормални човешки базални кератиноцити.

Дисертационният труд следва общоприетия модел. Прави впечатление стегнати изказ и логичното подреждане на изложената информация. В литературния обзор докторантката прави обширен анализ на публикуваните до момента научни изследвания, касаещи CaM - киназите и на базата на известните факти формулира целта на своята работа, а именно – да изследва участието на Ca^{2+} /калмодулин зависимата протеин киназа в клетъчния цикъл на човешки епидермални кератиноцити. Задачите, седем на брой, са точно формулирани и добре подбрани, така че да се изпълни поставената цел.

Трябва да се отбележи широкият набор от методи, които Силвия Календерова използва в своите изследвания – изолиране на първични кератиноцити и тяхното култивиране в автокринен режим, което само по себе си е деликатен и трудоемък процес, анализ на клетъчния цикъл с помощта на включен радиоактивен тимидин, получаване и пречистване на белтъчни лизати, имунопреципитация и имуноблот, измерване на активността на кинази посредством *in vitro* киназен тест, заглушаване на експресията на конкретни белтъци посредством антисенс олигонуклеотиди, EMSA (electrophoresis mobility shift assay), HPLC, както и статистически методи. За да установи вероятното участие на CaM – киназите, както и на JAK2/STAT и фосфатидилинозитол-3 киназата (PI3-K) в регулацията на деленето на кератиноцитите, докторантката използва специфични инхибитори за съответните ензими и измерва

понижаването на включения радиоактивно белязан по тритий тимидин, както и ефекта от тези третириания с инхибитори директно върху ензимната активност на имунопреципитирана MAPK. След като в хода на работата фокусът пада върху СаМКII δ като потенциалната изоформа, отговорна за контрола върху автокринната кератиноцитна пролиферация, Силвия Календерова използва анти- СаМКII δ антисенс олигонуклеотид и по този начин специфично потвърждава ролята на този ензим. В допълнение на изследванията до този етап, тя провежда проучване отново касаещо участието на СаМКII в регулацията на клетъчния цикъл, но вече в светлината на програмираната клетъчна смърт. За целта проследява участието на ензима в индуцирането на апоптоза в A431 клетъчната линия след третиране с UV светлина.

В резултат на задълбочените си проучвания, Силвия Календерова за пръв път доказва участието на СаМ киназите като важно звено в регулацията на деленето на епидермалните кератиноцити, реализиращо се чрез активиране на MAPK каскада и свързването на транскрипционния комплекс c-Myc/Max/Mad към ДНК. Освен това тя доказва, че най-вероятно СаМКII δ е изоформата, отговорна за MAPK-зависимата кератиноцитна пролиферация. Установява също така, че СаМКII δ участва и в процеса на стимулираната от UV светлина програмирана клетъчна смърт, активирайки последователно каспаза-8, а след това и ефекторната каспаза-3. В допълнение е показано и че JAK/STAT трансдукционният път е независим от MAPK автокринен път на активиране на деленето на епидермалните клетки. Докторантката ясно илюстрира и подробен критично обсъжда получените резултати, базирайки се на известните литературни данни.

Резултатите от дисертационния труд са включени в 4 статии – две в списания с импакт фактор. В три от публикациите Силвия Календерова е водещ автор. Една от статиите ѝ е с 27 цитирания. Резултати са докладвани и на два международни научни форума.

Заключение: Дисертацията на Силвия Календерова е посветена на изследването на изключително актуалния въпрос, касаещ основните трансдукционни механизми, регулиращи пролиферацията на човешките епидермални кератиноцити. Написана е ясно и стегнато. Наборът от използвани методи и обемът на извършената работа са внушителни. Резултатите са оформени прецизно. Броят статии, в които докторантката публикува резултатите си, както и техните цитирания са не само достатъчни, но и надвишават установените изисквания от Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на МУ-София за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“. Ето защо убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди тази степен на Силвия Календерова – Вълкова.

София, 19. 11. 2018г.

Подпис:

/Акад. проф. В. Митев/

