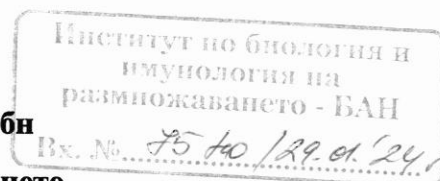


СТАНОВИЩЕ

от Проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

Институт по биология и имунология на размножаването

„Акад. Кирил Братанов“ - БАН



на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор' професионално направление 6.3 Животновъдство, научна специалност: "Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването" (04.02.01)

Автор: д-р Елина Димитрова Аврамска

Форма на докторантурата: редовна форма на обучение

Секция/Лаборатория: Лаборатория по репродуктивни ОМИКс технологии

Тема: „Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет“

Област 6 на висшето образование Аграрни науки и ветеринарна медицина,

Научен ръководител: проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

бщо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Българска Академия на Науките, както и Правилник за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България в ИБИР-БАН 2022 г.), и включва следните документи: заповед за научно жури, автобиография в европейски формат с подпис на докторанта; нотариално заверено копие от диплома за висше образование; заповеди за записване в докторантура; заповед за отчисляване с право на защита; протокол за издържан докторантски минимум по специалността; дисертационен труд; автореферат; списък на научните публикации по темата на дисертацията; копия на научните публикации; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи, Протокол от разширен съвет на Лабораторията за даване ход на защита и избор на НЖ, Сертификати за обучение в Докторантско училище с взети кредити.

Докторантката е съавтор приложила 2 публикации. Документите са прегледно подредени в папки и адекватно наименувани. Д-р Елина Аврамска е завършила магистърска програма по Ветеринарна медицина в Лесотехнически университет София. Елина започна своята докторантура през мес. януари 2014 год. и прояви значителен интерес към еукариотното клетъчно култивиране и функционалните изследвания с използване на *in vitro* клетъчни култури.

актуалност на тематиката

Разглеждането на проблемите с репродуктивното здраве в България е от изключителна актуалност, особено в контекста на прогнозите на ООН за значително намаление на населението в следващите десетилетия. Според тези прогнози, България ще изпита драстичен спад в демографската си структура, което поставя страната пред сериозни социални и икономически предизвикателства. Проблемите, свързани с инфертилитета и в частност мъжкия инфертилитет, стават все по-значими. Епидемиологичните данни показват, че четвърт от мъжете и жените са засегнати от репродуктивни проблеми, което подчертава необходимостта от по-задълбочени изследвания и разработване на ефективни подходи за лечение. Целта на дисертационния труд, разглеждащ епигенетични регулаторни механизми и

тяхното влияние върху кръвно-тестикулярната бариера и антиген-представящите функции на клетките на Сертоли, е изключително релевантна. Тя се фокусира върху разбирането на сложните молекулярни и клетъчни процеси, които участват в репродуктивното здраве. Това разбиране е критично за идентифицирането на потенциални терапевтични цели и разработването на стратегии за лечение на репродуктивни разстройства. Също така, този фокус е особено важен в контекста на увеличения процент на мъжки инфертилитет и свързаните с него здравословни усложнения. Задачите, поставени в рамките на дисертационната работа, са директно свързани с разглеждането на ключови молекулярни пътища на вродената имунна сигнализация в контекста на репродуктивното здраве и ролята на ДНК метилирането, за регулацията им. Такива изследвания са от решаващо значение за идентифицирането на нови подходи за превенция и лечение на репродуктивни разстройства, особено в светлината на нарастващата честота на инфертилитета сред българското население. Изследването на сигналните оси на вродена имунна сигнализация от семействата TLR4, NOD1/2 и инфламазомите, каквато е NLRP3, биха намерили и приложение в биотехнологиите, и развъждането, както по отношение на контрол на процесите и загубата на оплодителна способност в разплодниците, така и по отношение на подходи за контрол на репродукцията на определени видове. В заключение, дисертационният труд продължава важни научни изследвания, които могат да имат значително въздействие върху подобряването на репродуктивното здраве и ефективността на разплодниците.

ознаване на проблема

Докторантката е добре запозната с проблема и притежава задълбочени познания и разбиране по темата на своята дисертация. Литературният обзор, който покрива области като връзката на клетките на Сертоли с мъжкия инфертилитет, рецепторите на вродения имунен отговор, инфламазомата NALP3, както и епигенетичната регулация на генната експресия, показва, че докторантката е в състояние да анализира и интегрира сложни научни концепции. Особено добро впечатление прави задълбоченото представяне на темите, свързани с ДНК метилирането и различните аспекти на епигенетичната регулация, геномното разпределение на оксидирания метилцитозин, технологиите за картографиране на генома и хистоновите белтъци. Тази подробност и широта на покритие са индикатори за високо ниво на разбиране и умения за изследване, което е от съществено значение за успешното завършване на докторска дисертация.

методика на изследването

Избраната методика е модерна, релевантна, адекватно избрана за постигане на поставените задачи. Използван е функционален *in vitro* модел с клетъчна линия 15P-1 от обезсмъртени миши Сертоли клетки, изолирани от половозрели мишки. Използването на стабилна линия е позволило генерирането на стабилна суб-линия с репортер реагиращ на активирания NF- κ B комплекс, водещ до отделяне на детектируема в културелната среда секреторна алкална фосфатаза. Използването на стабилна линия намалява и индивидуалните вариетети и позволява по-лесно идентифициране на клетъчно-специфични феномени, като премахва междувидовите разлики в отговора. Изследвани са и йонни калиеви потоци посредством комбинация от талиево-реагиращо флуоресцентно багрило и високо-скоростна флуоресцентна детекция осъществена с qPCR. Функционални тестове са проведени в условия без и със генно заглушаване посредством транзиторна трансфекция със siRNA и стимулация на рецептори на вроден имунен отговор с техните директни лиганди. Активацията на инфламазомата NLRP3 е проверена с ефекторните и звена – активация на каспаза-1 посредством хромогенен субстрат и секреция на активен цитокин – IL-1beta, посредством ELISA метод. Генната експресия е оценявана на транскриптно и протеиново ниво, съответно посредством RT-qPCR и проточна флуцитометрия. Изследването започва с провеждане на дву-дименсионална гел-електрофореза и последващ образен анализ на 2D гел електрофоретични изображения и биоинформатичен анализ за генериране на хипотези въз

основа на предсказани протеинови съответствия. Изведени са статистически обогатени сигнални пътища, взаимовръзки между предиктивна протеинова детекция и хистоновы взаимодействия или други епигенетични механизми на регулация. Статистическите методи също за напълно адекватно подбрани в зависимост от приложението.

арактеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационния труд е много добре написан (162 стр.), съдържа всички необходими раздели – въведение, литературен обзор, работна хипотеза, цели и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, заключение, изводи и оригинални приноси. Обзорът е добре онагледен (стр.), материали и методи е много подробен (19 стр.) и позволява повторимост на експериментите. Оригиначните данни изложени в резултати (48 стр.) са публикувани в реферирани и индексирани международни издания с импакт фактор, гарантирайки неговото предварително валидиране от международната научна общност. Дискусията (18 стр.) е съобразена с известното в научната литература в момента, като към резултатите е подхотено отговорно, с нужната критичност към собствените данни.

Дисертационния труд сравнява нетретирани с TLR4 активирани и потискани по ДНК метилиране Сертоли клетки от полово зрели мишки, като идентифицира протеинови петна от които посредством данните за pK/MW се предсказват потенциални протеини способни да допринесат за подобно дву-димерно изображение. Установява се връзка между епигенетични регулаторни протеини и установените профили на експресия, след индукция на TLR4, както и повлияни сигнални пътища след тотално ДНК деметилиране. Това дава насока за изследване на две сигнални оси - NF-κB и MAPK1/ERK2, които са проследени директно за NF-κB посредством репортерен плазмид, и индиректно за MAPK1/ERK2, посредством генно заглушаване. Установени да и промени в калиевия инфлукс през бавните Шейкър канали при стимулация на TLR4 и е направена взаимовръзка между K⁺ йонни потоци, MAPK2 път и TLR4 сигнализация, както и в ефекторна посока към активация на каспаза-1 и секреция на IL-1β. Проследена е и връзката с клетъчната пролиферация, миграция и клетъчната смърт.

В дисертационния труд са посочени 7 основни *извода*, които биха могли да се систематизират до следните обобщения: ДНК метилирането като механизъм за генно заглушаване е свързано с регулирането на MAPK сигналните пътища, особено на MAPK1/ERK2, MAPK3, p38 MAPK, както и експресията на пътищата на вродена имунна сигнализация с участието на рецепторите NOD1, NOD2 и ефекторната инфлазазома NALP3; Установено е, че въздействието на LPS води до активиране на сигнални пътища от вродената клетъчна сигнализация на TLR4 със значително повлияване на пътищата от MAPK семейството, включително EKR (MAPK), JNK, както и тези на EGF/FGF рецепторите. В интактни условия MAPK1 ограничава активирането на NF-κB и каспаза-1, като заглушаването на гена *mapk1* води до спонтанно активиране на каспаза-1. Индуцирането на TLR4 в *mapk1* заглушени условия води до увеличаване на клетъчната миграция и клетъчната пролиферация. Показана е ATF доза-зависима клетъчна смърт след стимулиране на оста TLR4 (LPS) / NOD1 каспаза-1 - IL-1β. Показана е хипотетична връзка между взаимодействието на TLR4-TRAF6-NF-κB, (FSH)-МЕК/MAPK1(ERK2), йонните потоци, NLRP3 инфлазозомната активация – Caspase-1-IL-1β и автофагията.

Дисертационния труд има следните оригинални *приноси*: 1. Установени са важни прицелни пътища за регулиране, свързани с TLR4 сигнализацията, и отключваните от нея или съществуващи отделно епигенетични механизми за контрол на елементи на вродената имунна сигнализация, като MAPK сигнализация, особено EKR2/MAPK1, както и влиянието на йонните канали в тази регулация. Тези промени могат да бъдат свързани с клетъчната смърт (апоптоза или пироптоза). 2. Лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфлазозомата NALP3 (ATP) водят до свръхрегулиране на про-IL-1β, активиране на каспаза-1 и индуциране на секреция на IL-1β и евентуално на клетъчна смърт.

на TLR4 има потискащ ефект върху активирането на NF-кВ, клетъчната пролиферация и миграцията. Всички получени резултати могат да имат и транслационен характер в клиничната практика, във връзка с наличието на увеличени нива на цитокини IL-1 β и IL-18 при инфертилни мъже, демонстрирайки значимостта на проучването и възможностите за внедряване.

реценка на публикациите и личния принос на докторанта

По процедурата са представени 2 публикации, от общо 4 публикации на докторантката. Личното участие на докторантката е явно от позицията и на първи автор, което е допълнителен атестат за приносите и към дисертационния труд.

Посочените публикации и другите документи свързани с дисертационния труд напълно съответстват на **критериите заложен** в ППЗРАСРБ за придобиване на ОНС „Доктор“.

втореферат

Авторефератът е също така надлежно оформен както и целия дисертационен труд, като отразява всички основни резултати, изводи и приноси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд **съдържа научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката** и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на ИБИР-БАН. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на БАН и Правилника на ИБИР за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантът *Елина Васева притежава* задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност **“Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването” (04.02.01)**, като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на *Елина Васева* в докторска програма по **“Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването” (04.02.01)**.

2

9

.

0

1

.

2

0

2

4

Г

проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн