

Институт по биология и
имунология на
размножаването - БАН

Вх. № 90-110/05.02.2024

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дбн Росица Конакчиева

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

върху дисертационен труд на **Илка Цветанова Цветкова-Иванова** за присъждане на образователната и научна степен «Доктор» в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Имунология“, шифър 01.06.23, на тема: „Изследвания на механизмите на клетъчна смърт и ролята на ефектора **Gasdermin D**, при индукция на инфламазомата **NLRP3**. Значение за нарушение на мъжкия фертилитет“

Научен ръководител: Проф. дбн Сорен Хайрабедян

Изготвянето на рецензия върху настоящия дисертационен труд се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилниците за неговото приложение, на Заповед № 108/ 17.10.2023 г. на Директора на ИБИР- БАН за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания, приети от НС на ИБИР-БАН за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности.

Докторантката е представила оригинален дисертационен труд и всички необходими документи за курса на обучение. Приложена е Справка от системата за плагиатство на ИМИ-БАН, чийто анализ показва отсъствие на значими сходства по отделните параметри над допустимите разпознавани от системата от метаданни. Приложената Справка за изпълнение на минималните национални изисквания съгласно ПЗАСРБ доказва наличие на необходимия минимум от 30 т. за докторант в професионално направление 4.3 Биологически науки.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидатката.

Професионален облик на докторантката

Висшето образование на Илка Цветанова Цветкова-Иванова включва диплома за бакалавър по Молекулярна биология 2017г, магистър по Биология на развитието 2019 г. придобити в Биологически факултет на СУ Св. Климент Охридски“. Непосредствено след завършването си продължава като докторант (2019 — 2023) в Лаборатория по репродуктивни ОМИКс Технологии, Институт по Биология и имунология на размножаването Акад. Кирил Братанов“, БАН. От 2019 е асистент в Лабораторията под ръководството на проф. Сорен Хайрабемян и проф. Красимира Тодорова. В кратката си научна кариера Илка Цветкова е отличавана с престижни научни награди, част от които получени в екипи от млади учени като кръжочник към Катедра Генетика, Биологически факултет, СУ Св. Климент Охридски“, София : 1/Втора награда за устен доклад, 2019 на 6th Black Sea International Immunology School, Тетевен, България; 2/Отборен сребърен медал, 2017 International Genetically Engineered Machine (iGEM) competition, Бостън, САЩ; 3/ Отборен бронзов медал, 2016 International Genetically Engineered Machine (iGEM) competition, Бостън, САЩ. В периода 2018-2023 е публикувала в съавторство пет публикации в списания с импакт фактор и има няколко участия в научни симпозиуми.

Актуалност на разработвания проблем

Избраната тема е много актуална от областта на репродуктивната медицина и по-специално репродуктивна имунология. Третира чрез фундаментален научен подход проблема за имунологично обусловена увреда на сперматогенната функция вследствие на преживяна инфекция, или т.нар. идиопатични нарушения с неизяснен характер. Проява на автоимунна реакция към антигени на половите клетки са една от възможните причини за стерилитет. При нормални условия, кръвно-тестикуларната бариера създава имунологично-толерантна среда, подходяща за зреещите сперматиди. При различни условия като травми или хронично възпалително (инфламаторно) увреждане на ендотела целостта на тази бариера може да бъде компрометирана. В следствие, клетки на имунната система могат да достигнат и атакуват елементи от собствената полова система в тестисите, в резултат от което да се формират антитела срещу нейни компоненти. Сертолиевите клетки са сред основните участници, съхраняващи и предпазващи половите клетки. Наличието на каспази и възможността за отделяне на възпалителни цитокини, провокирано от продължителни възпалителни реакции, биха могли да доведат

до нарушение на техните функции, засягащи в голяма степен възможността за правилно протичане на сперматогенезата. Активирането на апоптотичните пътища е по-щадящият път за клетъчна смърт, водеща до предпазване на съседни клетки, но силни възпалителни процеси и невъзможността на клетката да се справи с инфекциозен агент, водят до активацията на пироптотични такива, провокиращи съседни или имунни клетки. Медирана от газдермини пироптоза активира изчистването на патогените и може да подпомогне възстановяването на хомеостазата, но нерегулираната пироптоза е в основата на много патологични състояния, медирани от възпаление. Основавайки се на тази хипотеза авторката се насочва към проследяването и детайлно наблюдение на конкретния вид клетъчна смърт, настъпваща в следствие от активиране на про-апоптотични и про-пироптотични каспази, тяхната взаимовръзка и пътища на активация.

Обща характеристика на дисертационния труд

Представената дисертация е структурирана и оформена според изискванията. Дисертационният труд е написан върху 136 страници, съдържа три схеми в литературния обзор, една диаграма визираща работна хипотеза и 40 комплексни фигури, съчетаващи снимков микроскопски материал или хистограми с графични фигури отразяващи количествените показатели след извършена статистическа обработка. Уводът въвежда в темата и съдържа мотивите за разработване на дисертацията. Следват Глава Литературен обзор от 35 стр. завършваща с Обобщение, Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 13 стр. Най-голяма част от труда заема глава Резултати – 50 стр., следвана от обстоятелствена Дискусия върху 11 стр. Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр. Използвани са 213 литературни източника, включващи съвременни публикации по темата вкл. най-нови – след 2015г. Това е свидетелство за актуалността на представения труд и стремежа на кандидатката да допълва и усъвършенства професионалния си опит.

Целта на дисертационния труд е кратко и ясно формулирана: **Да се изследват механизмите на клетъчна смърт в клетки на Сертоли и свързаните с тях сигнални пътища включващи основните каспази и Gasdermin D.**

Поставени са основни тематични задачи, изчерпващи предмета на дисертацията. Намирам че задача 3. не е поставена достатъчно конкретно и представя по-скоро методична задача подчинена на останалите.

Използвани са най-съвременни методи от арсенала на клетъчната и молекулярна биология и имунология, които позволяват да бъдат анализирани и изведени оригинални

резултати със статистическа достоверност и фундаментален принос. Наред с рутинните методи на криоконсервация и клетъчно култивиране, впечатление прави и използването на високо информативни аналитични методи като проточна флоуцитометрия, количествен ДНК анализ (RT-qPCR), новогенерационно нанопорово секвениране на Сертолиевы клетки 15P-1, ELISA методи, флуоресцентен микроскопски анализ на каспазна активност и клетъчна смърт, и други. Използвани са експериментални клетъчни модели за активиране на макроавтофагия и митофагия в Сертолиевы клетки. Статистическият анализ е проведен и отразен компетентно, което дава възможност да бъдат изведени оригинални достоверни зависимости отразени в гл. Изводи.

Методите са описани добросъвестно и достатъчно информативно без излишни подробности, Приложени са описания на апаратурата, химикалите и китовете, които говорят за висок клас оборудване и съвременно професионално ниво. Свободното и ясно боравене с терминологията и адекватното описание на методите говорят за натрупания от дисертанта богат експериментален и методичен опит.

Описанието на този раздел дава кратка представа за извършената огромна по обем и трудоемкост работа, в резултат на която са получени убедителни данни позволяващи да бъдат формулирани оригинални изводи.

Резултатите от дисертационния труд са представени върху 50 страници и следват поставените задачи. Изследвана е активацията на TLR4 и инфламазомата Nlrp3 в контекста на пироптоична клетъчна смърт; активността на каспаза-1 върху настъпването на пироптоична клетъчна смърт след стимулация на рецептора TLR4 с LPS и активация на Nlrp3 с ATP. Проучени са типовете клетъчна смърт, която се наблюдава след активацията на инфламазомния път проследявайки експресията на инфламазомата Nlrp3 и свързаната с нея активация на каспаза-1 и каспаза-3; проучено е влиянието на експресията на адапторния протеин ASC в клетки на Сертоли върху активацията на каспаза-1 и каспаза-3 след стимулация на рецептора TLR4 с LPS и активация с ATP; изследвано е влиянието на Asc върху експресията на транскриптите на Nlrp3; динамично е проследена активация на каспазите в различни времеви точки във връзка с активиране на апоптоза в клетки на Сертоли. Извършено е нанопорово секвениране на Сертолиевы клетки от линия 15P-1 което допринася за установена връзка на рецептора Cd300a с инфламазомния път на Nlrp3 както и на изпълнителя на пироптоичната клетъчна смърт GSDMD с каспаза-1 и каспаза-3, насочващи клетката към различен тип клетъчна смърт.

Дискусията съдържа обстоен анализ на изследваните сигнални фактори и клетъчни процеси в Сертолиевы клетки при различни експериментални модели свързани с про-инфламаторен статус при бозайници и човек. Резултатите са дискутирани в светлината на най-нови открития свързани с експресията на инфлазамите активиращи каспаза-зависими сигнални пътища и насочването към различна клетъчна съдба на Сертолиевите клетки.

Въз основа на анализ на получените данни по отделните задачи са формулирани шест извода, които отразяват коректно изследователската работа и получени резултати и приемам по същество. Приносите отразяват по същество оригиналните находки в дисертационния труд и приемам изцяло. В съвкупност, получените резултати дават основание дисертационния труд да бъде възприеман като обстоен фундаментален труд със стойностни научни резултати получени в оригинални експериментални модели и перспективи за приложение в репродуктивната имунология и медицина.

Заключение

Настоящият дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на съвременната имунология и молекулярна биология, които са позволили установяването на оригинални научни резултати чрез получаването на информация на съвременен научно ниво. Имайки предвид професионалните качества на докторантката, която имам удоволствието да познавам още от нейните студентските години в БФ на СУ „Св. Климент Охридски“, както и научните постижения в настоящия труд, изразявам своята положителна оценка за представения дисертационен труд.

Убедено предлагам на Уважаемите Членове на Научното жури назначено със Заповед на Директора на ИБИР-БАН да присъдят на Илка Цветанова Цветкова-Иванова образователната и научна степен ”Доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност Имунология (ш. 01.06.23).

03.02.2024 год.

Рецензент:

проф. дбн Росица Конакчиева