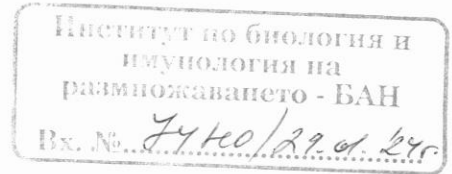


СТАНОВИЩЕ



от доц. д-р Велислава Илиева Терзиева, д.м. , Институт по биология и имунология на
размножаването „Акад. К. Братанов“, БАН

на дисертационен труд 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 “**

на Илка Цветанова Цветкова-Иванова, докторант

Лаборатория по ОМИКС технологии,

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“, БАН

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3 Биологически науки, Област 4. Природни науки,
математика и информатика,

Шифър 01.06.23

Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника за приложението му в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“, БАН.

Актуалност на научния проблем

Актуалността на научния проблем е представена синтезирано в увода на дисертационния труд и е аргументирана в детайли в литературния обзор. Видно е, че тя е в три посоки. Научното направление е в проучване ролята на ключови фактори на естествения имунитет, каквито са каспаза-1, каспаза-3, адапторния протеин Asc, CD300a, Gasdermine E за индукция на инфламазомата NLRP3 и механизмите на клетъчна смърт. Приложното направление е обосновано от значението на тези механизми за изясняване причините за мъжкия стерилитет. Работата има и социален аспект, предвид нарастващия брой клинични случаи с т.нар. “мъжки фактор”, а предвид

получените резултати, насочва и в посока, отвъд областта на репродуктивната имунология и биология. Широкият обхват на литературните източници - от 70-те години на XX в. до наши дни, не само потвърждава казаното, но е и израз на отличната теоретична подготовка на дисертантката.

Това обуславя до голяма степен актуалността и значимостта на дисертационния труд на Илка Цветанова-Иванова.

Въз основа на гореизложеното приемам изследвания проблем за актуален.

Аргументация на направените изследвания

Дисертантката е обосновала необходимостта от изследванията си в първата част – литературен обзор. В рамките на около 24 страници, Илка Цветанова-Иванова прави подробен анализ на литературата (213 автора за период от повече от 50 години), посветена на клетъчните и молекулярни механизми на клетъчна смърт в общобиологичен смисъл, но и спрямо имунологично привилегировано място, каквото са Сертолиевите клетки. В последния параграф са изведени научните проблеми, информацията за които е оскъдна и чието изясняване може да има съществен фундаментален и медицински принос.

Цел и задачи

Целта и поставените седем задачи са формулирани ясно и кратко. Те произхождат от данните в литературния обзор и от изведените в обобщението заключения.

Материали и методи

Разделът обхваща 14 страници с обособени два подраздела - материали и методи. В “Материали” в детайли са представени всички материали, които са използвани в експерименталната работа, вкл. източник, работни концентрации, основни характеристики (особено важно за клетъчните линии), кратка обосновка с литературна справка защо е предпочетен даденият материал.

Избраните методи, в по-голямата си част, са основани на най-съвременните научни и технологични достижения, което прави този раздел изключително ценен. Подробното описание не само позволява възпроизвеждането на методите, но е и доказателство за придобитите знания и практически умения на дисертантката. Разнообразието на методите приемам като основа за получаване на достоверни резултати.

След раздел “Материали и методи” и преди “Резултати”, е добавена страница, на която схематично е представена работната хипотеза. Оценявам високо това, като израз на усвоени знания, умения и аналитично мислене.

Резултати

Разделът Резултати обхваща 49 страници, 40 фигури и включва 16 подзаглавия. Подреден е логично – от фенотипните изменения до подробно и детайлно изследване на възможните причини. Представени са доказателства за самостоятелното изследване на отделните молекули - каспази 1 и 3, инфламазомата Nlrp3, адапторния протеин ASC, CD300a, ефектът на различни активационни сигнали през TLR4 и динамичните промени в различни времеви точки. Показано е водещото значение на CD300a в активиране на автофагията и сигнализацията в хода на възпалителната реакция в клетките на Сертоли. Оценявам високо постигнатите резултати и представените снимки и анализи. Изследването на елементите на вродения имунитет е предизвикателство, а тук се вижда цялостен и задълбочен подход в това направление. Получените резултати са обобщени в данните от нанопоровото секвениране и изведените реактомни пътища, регулирани от генните транскрипти, завишени след активация в миши геном и представени на фиг. 32. Доказана е връзка на изпълнителя на пироптоичната клетъчна смърт GSDMD с каспаза-1 и каспаза-3, насочващи клетката към различен тип клетъчна смърт. В последния раздел на “Резултати” е изследвана връзката между микроавтофагия и “сигнали за опасност” като LPS, основани на TLR4 активирането, което приемам не само като обобщение на получените резултати, но и като поставяне на нови въпроси за по-нататъшни изследвания.

Дискусия

Разделът дискусия е написан на 12 страници, стегнато и подредено. Получените резултати са обсъдени в светлината на литературните данни по направлението вроден имунитет и молекулярните механизми, определящи клетъчната съдба при активиране на TLRs. Впечатление прави аналитичният подход на изложението. Дискусията завършва със заключение, в което са очертани и перспективите за продължаване на работата.

Изводи

Направени са шест извода, които съответстват на получените резултати.

Въз основа на тях са изведени три приноса, които отразяват получените резултати.

Всъщност, приносите на дисертационния труд са повече и се изразяват в няколко посоки: в избраната тематика - естествен имунитет, в съчетанието на методи и анализи, които напълно отговарят на съвременните изисквания за научна работа, в прецизния научен стил на писане, за което трябва да подчертая и приноса на научния ръководител проф. д-р Сорен Хайрабедян. Видно, че само малка част от резултатите е публикувана и отправям препоръка останалите данни също да бъдат оповестени.

Имам един въпрос към дисертантката: Имате ли данни за активиране на подобни или различни от посочените в дисертацията механизми на естествения имунитет в други имунологично привилигирани места?

Дисертантката е обобщила получените резултати в две публикации, на които е първи и втори автор. И двете са в международни списания с импакт фактор. Представен е списък с три участия в международни научни форуми.

В заключение, представеният ми за становище дисертационен труд е изключително интересен и богат на подходи и получени резултати. Видно, че дисертантката е овладяла голям брой методи и може самостоятелно да организира и извършва експерименталната работа, и да анализира получените резултати. Това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото научно жури да гласува положително за присъждане на научната и образователна степен "доктор" на Илка Цветанова Цветкова-Иванова.

28.01.2024 г.

София

С уважение:

доцент, д-р Велислава Терзиева, дм

VELISLAV Digitally signed
by VELISLAVA
A ILIEVA ILIEVA TERZIEVA
TERZIEVA Date: 2024.01.29
08:59:56 +02'00'

OPINION

by Assoc. Dr. Velislava Ilieva Terzieva, MD, PhD , Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. K. Bratanov", BAS

of a dissertation on:

"STUDY OF THE MECHANISMS OF CELL DEATH AND THE ROLE OF THE GASDERMIN D EFFECTOR IN NLRP3 INFLAMMASOME INDUCTION." SIGNIFICANCE OF MALE FERTILITY DISORDER"

of Ilka Tsvetanova Tsvetkova-Ivanova, PhD student

Laboratory of OMICS technologies,

Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. K. Bratanov", BAS

for the acquisition of an educational and scientific degree "Doctor"

Professional direction 4.3 Biological sciences, Area 4. Natural sciences, mathematics and informatics,

Cipher 01.06.23

The review was prepared in accordance with the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff of the Republic of Bulgaria and the Regulations for its Application at the Institute of Reproductive Biology and Immunology "Acad. K. Bratanov", BAS.

Relevance of the scientific problem

The topicality of the scientific problem is presented in a synthesis in the introduction of the dissertation and is argued in detail in the literature review. It can be seen that it is in three directions. The scientific direction is in studying the role of key factors of natural immunity, such as caspase-1, caspase-3, the adapter protein Asc, CD300a, Gasdermine E for the induction of the NLRP3 inflammasome and the mechanisms of cell death. The applied direction is justified by the importance of these mechanisms for clarifying the causes of male sterility. The work also has a social aspect, given the growing number of clinical cases with the so-called "male factor", and given the obtained results, points in a direction beyond the field of reproductive immunology and biology. The wide range of literary sources - from the 1970s to the present day, not only confirms what has been said, but is also an expression of the excellent theoretical preparation of the doctoral student.

This largely determines the relevance and significance of Ilka Tsvetanova-Ivanova's dissertation work.

Based on the above, I consider the researched problem to be relevant.

Argumentation of the research done

The dissertation student justified the need for her research in the first part - a literature review. Within about 24 pages, Ilka Tsvetanova-Ivanova makes a detailed analysis of the literature (213 authors over a period of more than 50 years) dedicated to the cellular and molecular mechanisms of cell death in a general biological sense, but also in relation to an immunologically privileged place, such as Sertoli cells. In the last paragraph, the scientific problems about which the information is scarce and whose clarification could have a significant fundamental and medical contribution are brought out.

Purpose and tasks

The goal and the seven tasks set are clearly and concisely formulated. They originate from the data in the literature review and from the conclusions drawn in the summary.

Materials and methods

The section covers 14 pages with two separate subsections - materials and methods. All materials used in the experimental work are presented in detail in "Materials", incl. source, working concentrations, basic characteristics (especially important for cell lines), brief justification with literature reference why the given material is preferred.

The chosen methods, for the most part, are based on the most modern scientific and technological achievements, which makes this section extremely valuable. The detailed description not only allows the reproduction of the methods, but is also evidence of the acquired knowledge and practical skills of the dissertation. I accept the variety of methods as a basis for obtaining reliable results.

After the "Materials and methods" section and before "Results", a page has been added, on which the working hypothesis is schematically presented. I highly value this as an expression of acquired knowledge, skills and analytical thinking.

Results

The Results section covers 49 pages, 40 figures and includes 16 subheadings. It is arranged logically - from the phenotypic changes to a detailed and detailed examination of the possible causes. Evidence is presented for the independent study of individual molecules - caspases 1 and 3, the Nlrp3 inflammasome, the adapter protein ASC, CD300a, the effect of different activation signals through TLR4 and the dynamic changes at different time points. The leading role of CD300a in the activation of autophagy and signaling during the inflammatory response in Sertoli cells is shown. I highly appreciate the results achieved and the photos and analysis presented. The study of the elements of innate immunity is a challenge, and here we see a comprehensive and thorough approach in this direction. The results obtained are summarized in the nanopore sequencing data and the inferred reactome pathways regulated by the gene transcripts upregulated after activation in the mouse genome and presented in Fig. 32. The pyroptotic cell death executor GSDMD has been

shown to be associated with caspase-1 and caspase-3, directing the cell to a different type of cell death. In the last section of "Results" the relationship between microautophagy and "danger signals" such as LPS based on TLR4 activation is investigated, which I take not only as a summary of the obtained results, but also as posing new questions for further research.

Discussion

The discussion section is written in 12 pages, tight and organized. The obtained results are discussed in the light of the literature data in the areas of innate immunity and the molecular mechanisms determining cell fate upon activation of TLRs. The analytical approach of the exhibition makes an impression. The discussion ends with a conclusion, in which the prospects for continuing the work are outlined.

Conclusions

Six conclusions are made that correspond to the results obtained.

Based on them, three contributions are made that reflect the obtained results.

In fact, the contributions of the dissertation work are more and are expressed in several directions: in the chosen topic - natural immunity, in the combination of methods and analyzes that fully meet the modern requirements for scientific work, in the precise scientific style of writing, for which you must I also emphasize the contribution of the scientific supervisor Prof. Dr. Soren Khairabedian. It can be seen that only a small part of the results has been published and I recommend that the rest of the data be made public as well.

I have a question for the dissertation student: Do you have data on the activation of similar or different mechanisms of natural immunity than those indicated in the dissertation in other immunologically privileged places?

The dissertation student summarized the obtained results in two publications, of which she is the first and second author. Both are in international impact factor journals. A list of three participations in international scientific forums is presented.

In conclusion, the dissertation work presented to me for opinion is extremely interesting and rich in approaches and obtained results. It can be seen that the doctoral student has mastered a large number of methods and can independently organize and carry out the experimental work and analyze the obtained results. This gives me reason to confidently recommend to the respected scientific jury to vote positively for awarding the scientific and educational degree "doctor" to Ilka Tsvetanova Tsvetkova-Ivanova.

01/28/2024

Sofia

VELISLAVA
ILIEVA
Sincerely: TERZIEVA

Assoc. Prof., Dr. Velislava Terzieva, MD, PhD

Digitally signed by
VELISLAVA ILIEVA
TERZIEVA
Date: 2024.01.29
13:37:47 +02'00'