

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Десислава В. Абаджиева,

при Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по професионално направление 6.3 Животновъдство /Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването, ш. 04.02.01/

редовен докторант **Елина Димитрова Аврамска**, към секция „Лаборатория по Репродуктивни ОМИКС технологии“ - ИБИР- БАН

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

научен ръководител: проф. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, дбн

### 1. Общо представяне.

Представеният дисертационен труд на Елина Димитрова Аврамска на тема „Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет“ е оформен според всички изисквания. Заедно с посочените наукометрични показатели съответстват на Правилника за развитие на академичния състав на ИБИР-БАН, като покриват изискванията на ЗРАС в РБ и Правилника му за приложение относно процедура за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“.

Елина Аврамска е завършила спец. „Ветеринарна медицина“ при ЛТУ (2013 г.) и е зачислена като редовен докторант през 2014 г. Прекъсване, поради майчинство, е удължило срока на докторантурата ѝ (съгласно Протокол 67 /2018г. на НС-ИБИР, считано от 02/2019 г.), с право на защита 5 години след отчисление съгласно чл. 62, ал.2 от Правилник за прилагане на ЗРАС в РБ в ИБИР (09/2015 г.).

### 2. Актуалност на тематиката.

Актуалността на дисертационния труд е подчертана, изхождайки от заложените тема и проблеми на изследването, в частност мъжки репродуктивен потенциал и рецепторите на

вроден имунитет.

За отглеждането и поддържането на хилядите сперматогенни клетки до тяхната пълна зрялост, „грижи“ полагат Сертолиевите клетки, затова биват определяни като „майка“ на сперматогенезата. Тези клетки се явяват и основен обект в настоящето изследване. И макар те да са соматични, а не герминативни, са изключително важни, защото дават структурна и хранителна подкрепа за развиващите се сперматозоиди; осигуряват не само тяхното съзряване от сперматогонии до зрели сперматозоиди, но и поддържат само обновяването на сперматогониалните стволови клетки. Тези специализирани епителни клетки, участват в кръвно-тестикуларната бариера, която разделя семенните тубули на две отделения и създава защитна и подхранваща среда за сперматозоидите. В дадени ситуации, те функционират като фагоцити за отстраняване на излишната цитоплазма и апоптотични сперматозоиди от семенните каналчета; секретират важни растежни фактори, цитокини, андроген- протеин, специфично свързващ се с тестостерона; експресират гена SRY, който представлява ключов елемент за тестикуларното развитие.

В клетките на Сертоли епигенетичните механизми регулират тяхната физиология, което е пример, че докторантката правилно е уловила една интересна област. Чрез подходящите молекулярно-биологични изследвания се задълбочава в по-малко проучените аспекти на поведението на зрелите Сертолиевы клетки, по-специално навлязла в проследяване на някои сигнални пътища, които пък от своя страна несъмнено се преплитат с епигенетични промени.

Тези факти ми дават пълното основание да смятам, че настоящият дисертационен труд е с подчертана съвременна актуалност и научна значимост.

### **3. Характеристика и оценка на дисертационния труд.**

Представената дисертация е структурирана и оформена според всички изисквания. Разписана е на 163 страници и съдържа 44 фигури и 4 таблици.

Трудът е структуриран по следния начин: въведение в темата, с акцент на актуалността и ясно подчертаване на проблема, които налага да се изследва функционалността на система от рецептори в клетките на Сертоли. Изложени са предпоставките на докторантката към функционирането на тези клетки подобно на други специализирани имунни клетки, и възможността за активирането на каспаза-1, респективно изхода от ситуацията.

Следва разделите «Литературен обзор» от 35 стр., «Цел и задачи» – 2 стр., «Материали и методи» – 19 стр., «Резултати» – 48 стр., «Дискусия» на важните резултати – 18 стр., «Изводи» – 1 стр., «Приноси» – 1 стр., «Библиография», описваща използваната литература – 29 стр., «Благодарности» – 1 стр.

Съотношението между отделните дялове литературен обзор: резултати: дискусия и други части е в приблизителни пропорции 1:1:1, което дава добър баланс на работата.

Литературният обзор е достатъчно информативен. В него докторантката намира връзка между клетките на Сертоли и мъжкия инфертилитет; проследява механизми на пътища от вродената клетъчна сигнализация; описва рецепторите на вродения имунен отговор и инфламазомата NALP3; прави цялостен поглед над епигенетичната регулация на генната експресия - от ДНК метилиране, геномно разпределение на оксидиран метилцитозин, РНК-базиран механизми до революционните афинитетно-обогатяващи подходи и base-resolution mapping (картографиране с базова разделителна способност).

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана и е насочена към определяне епигенетичните регулаторни механизми, които оказват влияние на каноничните сигнални пътища на активация на рецепторите от семейство NOD в клетките на Сертоли, въз основа на която са изведени 7 адекватни задачи. При изпълнението им за материал е послужила клетъчна линия 15P-1 (ATCC® CRL-2618™), която представлява Сертоли клетки, получени от тестисите на шест месечни трансгенни мъжки мишки. Допълнително, в лабораторията по Репродуктивни Омикс технологии при ИБИР-БАН, е създадена клетъчна линия 15P-1 (ATCC® CRL-2618™), съдържаща плазмид pNiFty2.

Докторантката отразява изработването на значителни по обем и сложност методичен инструментариум. Уменията ѝ са свързани с клетъчно култивиране и трипсинизиране на клетъчна линия, трансфекция, проточна флоуцитометрия, глобалното деметилиране, чрез обратно-транскриптна полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR), 2D електрофореза, биоинформационна систематика, статистика и др. Въпреки многобройността им, прави впечатление за логично съчетаване и надграждане.

Резултатите от дисертационния труд включват голяма част от представените фигури, с добро качество и аналитичен характер. Впечатление прави отделно обособеният раздел «Дискусия», където систематично са разгледани резултатите спрямо данните от литературата.

Напълно естествено следва интерпретативното формулиране на изводите, 7 на брой, отговарящи на поставените задачи, а именно: блокирането на ДНК метилирането, потенциално активира експресията на MAPK сигналните пътища; проведеното тотално деметилиране, потиска NOD2 и NALP3, и индуцира NOD1; въздействието на LPS води до активиране на сигнални пътища от вродената клетъчна сигнализация на TLR4 със значително повлияване на пътищата от MAPK семейството; стимулирането на лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфламазомата NALP3 (ATP) води до активиране на каспаза-1, до индуциране на секреция на IL-1 $\beta$  и до клетъчна смърт; в интактни условия MAPK1 води до потискане на NF-kB и контролира негативно каспаза-1; индуцирането на TLR4 в MAPK1 заглушени условия води до увеличаване на клетъчната миграция и клетъчната пролиферация; стимулирането на TLR4 (LPS) и последващото добавяне на ATP, като външен сигнал за увреждане, индуцира клетъчна смърт, по дозо-зависим начин.

Оригиналните научноизследователски подходи и получените резултати, изтъкват и приносите на разработката / разгледани в следващата точка от настоящата рецензия/.

Библиографичната справка се базира на 261 източника, от които 10% са само от последните две години. Това показва, че докторантката се е интересувала активно от проблематиката. Те са изведени по елегантен начин, така че не отежняват текста, а правят обзора и дискусията стегнати.

#### **4. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката.**

Основните постижения на труда са от научно-приложно естество и са резюмирани като три постулата, в които личи оригиналният приносен характер на разработката.

- Първият принос, касае установените важни прицелни пътища за регулиране, свързани с TLR4 сигнализацията, и отключването от тази сигнализация епигенетични механизми за контрол на елементи на вродената имунна сигнализация. За такъв авторката сочи MAPK сигнализацията, както и влиянието на йонните канали в тази регулация. Настъпващите промени могат да бъдат свързани с клетъчната смърт (апоптоза или пироптоза).

Погледът на колектива към връзката между сигнализирането на TLR4 и епигенетичните модификации разкрива част от механизмите, чрез които клетките се адаптират към стрес /в случая предизвикан от LPS/ и поддържат хомеостазата, което води до по-добро разбиране за това как стимулите от околната среда се превръщат в геномни отговори.

- Вторият много интересен и сериозен принос е свързан с лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфлазомата NALP3 (ATP), които водят до свръхрегулиране на pro-IL-1 $\beta$ , активиране на каспаза-1 и индуциране на секреция на IL-1 $\beta$  и евентуално на клетъчна смърт.

Подходът за изследването е осъществен, чрез проследяване влиянието на глобалното деметиране върху транскрипционните нива, посредством количествен RT-qPCR и проточна флоуцитометрия на протеиново ниво, отразяващи пълно сигналните пътища свързани с имунитет и клетъчното стареене и представяйки провъзпалителни цитокини и хемокини, които могат да индуцират възпалителни реакции и да набират имунни клетки към място на потенциални нараняване и/или инфекция.

- Третият принос е насочен към сигналния път MAPK1/ERK2, по който се ограничава активирането на NF- $\kappa$ B в интактни условия, докато индукцията на TLR4 за период от 24 часа има потискащ ефект върху активирането на NF- $\kappa$ B, клетъчната пролиферация и миграция.

Колективът потвърждава този си резултат и с функционално изследване над ефекта на индукция на TLR4. Установяват, че то води до повишено активиране на каспаза-1 и секреция на IL-1 $\beta$ , потиска се митофагията, а калиевият клетъчен поток се повишава, следователно

изведеният принос подчертава намаляването на шанса за клетъчно оцеляване при зададените условия. Освен пряката научна стойност, смея да твърдя, че проведеното изследване има принос и с практическо приложение. По-конкретно, една от тези приложения се изразява в изследването, включващо добавянето на АТФ в нарастващи дози - 1, 2, 10, 20 mM. Като външен сигнал за увреждане, то индуцира клетъчна смърт, която настъпва по дозо-зависим начин. Още по-интересно, при третиране на клетките с LPS и/или NOD1, съвместно с АТФ, клетъчните дехидрогенази значително се повишават. Смятам, че тези и други резултати от дисертацията имат свои приложен характер към фармакологично тестиране и медицинска диагностика. Разкриването на анализиранияте взаимодействия дават повече светлина върху репродуктивното здраве на мъжките индивиди, особено по отношение на сигнализация в клетките на Сертоли, които са от решаващо значение за сперматогенезата и функцията на тестисите.

### **5. Преценка на публикации и участие към дисертационния труд.**

Авторката представя 3 публикации, една от които в списание с ИФ, като приноса в тях на докторантката е значителен и е свързан с проучвания над Сертолиевите клетки, усвояването на молекулярно-биологичните методи за проследяване клетъчна миграция и пролиферацията, активирането на някой молекули, свързаните с това промени и отношението им в крайна сметка към клетъчната смърт.

Приложени са доказателствени материали за изяви на Елина Аврамска, по време на нейното обучение в редица научни събития, като COST Action TransAutophagy /2019 г./, Европейския имунологичен конгрес /Амстердам, 2018 г./, 5-ти Национален имунологичен конгрес /Пловдив, 2018 г./, няколко национални изяви, и не на последно място – личното ѝ участие в училище по Имунология в Румъния /6th SEEIS2014/. Ръководи проект към ДФНП 17/141 на тема: „Изследване на неканоничната инфлазомна вродена имунна сигнализация в епителни клетки, имащи значение за развитие на автоимунна патология, в това число и имунологично обусловен мъжки инфертилитет, с помощта на транскриптомика /RNA-seq/и епигеномика /5 mC-seq/, чрез директно молекулярно секвениране от 3-то поколение“. По отношение на всички тези активности, отбелязвам с положително отношение подкрепата на ръководителя към развитието на докторантката. Паралелно с това, личи личният ѝ принос при оформянето на настоящия дисертационен труд.

### **6. Критични бележки.**

По отношение на структурата на дисертационния труд нямам забележки. Не се откриват непълнота в раздел методи или дублиране на резултати. Работата е изключително стегната и стилна. Имайки предвид, че съм изготвяла предварително мнение, прави впечатлението, че докторантката е отразила забележките, поставени тогава. Единствено, в раздел Резултати е

останало дублирането в номерацията на фигура 4-26, но придружаващия текст внася яснота.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Настоящият дисертационен труд съдържа научни подходи, фундаментални и приложни резултати, които представляват оригинален принос за науката. Ясно личи, че докторантката Елина Аврамска е усвоила теоретични познания, покриващи образователната насоченост на степента за която кандидатства; също така тя прилага технически умения по съвременни методи, показващи уменията ѝ за овладяване на научната специфика, което я прави подготвен кадър по всички акредитирани професионални направления в ИБИР.

Както вече споменах, документално докторантката **отговаря на всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на този Закон.

Поради гореизложените ми убеждения, давам своята **положителна оценка** за представения проект на дисертационен труд на тема *„Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет“*, с което категорично подкрепям стартирането на процедурата по защита за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ **в професионално направление 6.3 Животновъдство на Елина Димитрова Аврамска.**

08-01-2024 г.

гр. София

Изготвил: ...

доц. Десислава Абаджиева