



РЕЦЕНЗИЯ

Изготвена от: проф. Пламен Тодоров, дбн, зав. секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ към Институт по биология и имунология на размножаването – БАН

Относно: Дисертация на тема „Изследване на механизмите на клетъчна смърт и ролята на ефектора Gasdermin D при индукция на инфламазомата NLRP3. Значение за нарушение на мъжкия фертилитет“, представена от Илка Цветанова Цветкова-Иванова, за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, в професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Имунология“, шифър 01.06.23.

Информация по процедурата: Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита по предложение на секция „Репродуктивни ОМИКС - технологии“ към ИБИР-БАН. Процедурата е приета и журито е утвърдено на Научен съвет на ИБИР. Представени са всички необходими документи, свързани с докторантурата. Считаю, че са спазени всички изисквания на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

Кратки биографични данни на кандидата: Илка Цветанова Цветкова-Иванова е родена през 1994г. в г. Ловеч. Получава висшето си образование в Биологическия факултет към Софийския университет „Свети Климент Охридски“, където през 2017г. се дипломира като бакалавър по специалност „Молекулярна биология“, а през 2019г. като магистър по специалност „Биология на развитието“. От 2019г. е зачислена като редовен докторант в ИБИР-БАН, работи и на допълнителен трудов договор като асистент в Института. Омъжена.

Личните ми впечатления от кандидата са положителни. Смяя да твърдя, че Илка Цветкова е висококвалифициран млад учен, владеещ съвременни методи за изследване и работа с клетъчни култури и генетични анализи. Ползва се с уважение от колегите, с които работи.

Актуалност на дисертационната тема: Безплодието (стерилитетът) е важен медико-социален проблем, засягащ 10-12% от двойките в репродуктивна възраст, като в голяма част от случаите причината е понижено качество на семенната течност. В повечето случаи това се дължи в нарушения в процеса на сперматогенеза. В този процес важна роля играят Сертолиевите клетки. Те участват в кръвно-тестикуларната бариера, формирайки имуно-привилегирована среда, а чрез сложна хормонална регулация осигуряват нормалното функциониране на тестисите. Интерес представлява изследване на факторите, инициращи клетъчна смърт в клетките на Сертоли. Дисертационният труд е посветен на изследване на молекулни механизми на апоптоза и пироптоза и свързаните с тях сигнални пътища в този вид клетки. В този аспект считаю, че темата е актуална и подобен род проучвания са важни не само в молекулярно-биологичен и имунологичен аспект, но и за репродуктивната биология и медицина.

Анализ и оценка на дисертационния труд

Структура: Дисертационният труд е написан на 136 печатни страници и структуриран, както следва: Увод – 3 стр., Литературен обзор – 25 стр., Цел и Задачи – 2 стр., Материал и методи – 15 стр., Резултати – 50 стр., Дискусия – 12 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Библиография – 17 стр. и Списък на публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията – 1 стр. Структурата на дисертацията съответства на общоприетите изисквания и е онагледена с 40 фигури, 1 диаграма и 3 схеми.

Увод: В увода кандидатът разглежда актуалността на проблема, като обосновава необходимостта от провеждането на проучванията, залегнали в основата на дисертационния труд.

Литературен обзор: Обзорът е обширен, като изчерпателно обхваща всички аспекти на проблема и дава информация, която обслужва избраната научна тема и има приносен характер. В началото му се дава информация за структурата и функциите на мъжките гонади и регулацията на сперматогенезата. Логично, с оглед тематиката на дисертационния труд, голяма част от обзора е посветена на Сертолиевите клетки – тяхната същност и функции, синтезираните от тях протеини. Представена е информация за петте основни класа рецептори за сигнали за опасност (PRRs) и осигуряването от тях механизми за съпротива, за толериране на щети и възстановяване на нормалното състояние. Описани са функциите и механизмите на действие на различни адапторни протеини, цитокини, каспази и газдермини. Голяма част от обзора е посветена на различните типове клетъчна смърт – автофагия, апоптоза, некроза, пироптоза, като по-голямо внимание е отделено на пироптозата и на механизмите на превключване на вида клетъчна смърт.

Обзорът е онагледен с 3 подходящи схеми, което го прави по-разбираем и лек за възприемане. Въз основа на набелязаните в обзора проблеми, авторът обосновава целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

Цел и задачи: Целта на дисертационния труд е да се изследват механизмите на клетъчна смърт в клетки на Сертоли и свързаните с тях сигнални пътища, включващи основните каспази и Gasdermin D. За изпълнение на поставената цел авторът разработва 7 задачи, които са достатъчно ясно и точно формулирани.

Материали и методи: Изследванията са проведени на базата на ИБИР-БАН. Като изследователски материал са използвани сертолиевы клетки от клетъчната линия 15P-1, изолирана от тестикуларни клетки на трансгенни 6-месечни мишки от American Type Culture Collection (ATCC).

В експериментите са използвани широка гама методи за изследване: клетъчно култивиране, микроскопия (включително флуоресцентна), проточна флуориметрия, Real-time qPCR, нанопорово секвениране, ELISA и др. Методиките са описани достъпно ясно и подробно, което позволява възпроизвеждане на експериментите. Използването на съвременна апаратура и среди и консумативи на водещи фирми-производители гарантира достоверността на получените резултати.

Не буди съмнение личното участие и принос на автора в експериментите. В това отношение ясно личи, че докторантът е усвоил и успешно прилага редица методи.

Резултати и дискусия: Получените от автора резултати най-общо могат да се разделят в няколко групи, съответстващи на поставените задачи.

Дисертантът установява, че третирането на клетките с LPS и АТР води до активиране както на каспаза-1, така и на каспаза-3, в резултат на което клетките се насочват към апоптоза или пироптоза, с преимуществено насочване към апоптоза.

Най-вероятно активирането на каспаза-1 се дължи на функционирането на повече от една инфлазази, тъй като клетките, които претърпяват клетъчна смърт, загиват при Nlrp3-Asc зависим път на активация на каспаза-1, а при живите клетки активността е по независим от тази ос път. Активацията на каспаза-3 е изцяло зависима от оста Nlrp3-Asc.

CD300a е двупосочен регулатор на активацията на каспаза-1, като наличието му ограничава настъпването на пироптоза по каспаза-1 зависим път, а липсата му води до ограничаване силната каспазна активност в живите клетки. Действието му върху активността на каспаза-3 е също двупосочно – стимулира активирането на каспаза-3 в живите клетки и ограничава активността ѝ в насочените към пироптоза клетки.

Активирането на инфламазомния път Nlrp3-Asc потенциира експресията на тотален GSDMD (неактивен тетрамер), но не и повишаване на активната му сръзана форма (C-терминален фрагмент). Експресията на рецепторът CD300a е нужна за нормалната експресия на тоталния GSDMD (неактивен тетрамер) и за активацията му.

GSDMD влияе върху каспаза-1 и каспаза-3 по различен начин – с инхибиторен ефект върху активността на каспаза-1 и активиращ върху каспаза-3.

Индуцираното от LPS сигнализиране, намалява специфичната митофагия в полза на неспецифичната макроавтофагия, в стресови условия с намалени нутриенти (глюкоза).

Резултатите са подкрепени с адекватно подбран и представен доказателствен материал. Снимките са с много високо качество. Приятно впечатление прави отличната статистическа обработка и представянето им в графики. Кандидатът е показал умение не само да тълкува собствените резултати, но и да ги съпоставя с данните, получени от други автори, което свидетелства за отлично познаване на материала.

Категорично съм убеден, че резултатите са оригинални и не може да става и дума за каквато и да било форма на плагиатство. Към документите има и приложена справка, че дисертационният труд е проверен за плагиатство с помощта на специализиран софтуер и такова не е установено.

Изводи и приноси: От извършените изследвания са изведени 6 извода, които приемам, и са формулирани 3 приноса. Изводите коректно отразяват получените резултати.

Литература: Приложен е библиографски списък от 213 заглавия, всичките на латиница. 47 от източниците са от последните 5 години. Те са цитирани коректно там, където трябва, съобразно задачите на дисертационния труд.

Публикации във връзка с дисертационния труд: Кандидатът е представил 2 публикации, и двете в списания с импакт фактор и квантил, с което покрива минималните национални изисквания за придобиване на образователната и научна степен доктор съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение. И в двете статии Илка Цветкова е водещ автор, което е индикация за активното и участие в проведените изследвания. Резултатите са представени и на няколко научни форума под формата на постери и доклади.

Автореферат: Авторефератът (42 страници) е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

Забележки към дисертационния труд: Основната ми забележка е към заглавието на дисертационния труд. Излишна е фразата „значение за мъжкия инфертилитет“. Изследванията и получените резултати имат чисто фундаментален характер, проведени са върху имортализирана линия клетки от мишки. Не се знае в каква степен биха се потвърдили при първична линия човешки Сертолиевы клетки и каква стойност биха имали за диагностика и лечение на мъжкия инфертилитет.

Имам и някои чисто технически забележки. Напр. понятията „диаграма“ и „схема“ в дисертационния труд според мен са излишни, би следвало да се използва терминът „фигура“ в описанието им.

Следва да се отбележи, че направените от мен критични бележки не са съществени и в никакъв случай не омаловажават достойнствата на представения ми за рецензия дисертационен труд.

Заключение: Представеният дисертационен труд на Илка Цветкова-Иванова е актуален от научна и практическа гледна точка. Налице е добър баланс в структурата между отделните части на научния труд, с превалиране на обема на научните резултати и тяхното обсъждане. В тази връзка, достойнствата на дисертационния труд и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии съгласно ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на ИБИР-БАН - София, ми дават основание да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на Илка Цветкова-Иванова научната и образователна степен „ДОКТОР“ по специалност 01.06.23. „Имунология“.

Дата: 09.01.2024г.

Изготвил рецензията:



/проф., дбн Пламен Тодоров/