



## РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. Д-р Сорен Б. 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 „4.3. Биологични науки“, от областна висшето образование „4.  
Природни науки, математика и информатика“  
докторска програма по акредитирано научно направление с шифър 01.06.23, „Имунология“

**Докторант:** Румяна Иванова Сусуркова

**Форма на докторантурата:** Редовна форма на обучение

**Лаборатория:** „Репродуктивни ОМИКс технологии“

**Институция:** Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, България

**Тема:** „Определяне ролята на Т клетъчните регулаторни механизми за развитието на нормална бременност при човек“

**Научен ръководител:** Доц. Д-р Велислава Терзиева, дм

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ утвърдена с Правилниците за приложение на ЗРАРСБ в БАН и Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН (ИБИР-БАН), както и съгласно Правилника на ИБИР-БАН за развитие на академичния състав. Докторантката е приложил 2 научни публикации, в реферирани и рецензирани списания, всички с импакт фактор, и 9 заглавия на съобщения от научни форуми, от които 4 са представени устно от автора. Дисертационния труд е прилежно оформен.

Румяна Сусуркова е изграден специалист в областта на репродуктивната биология и имунология. Тя завършва бакалавърска степен по молекулярна биология в Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, като се фокусира върху изучаването на екстрацелуларни матрични протеини и тяхното влияние върху миграцията и пролиферацията на клетките. След това, тя продължава образованието си в Софийския университет „Св. Климент Охридски“, където придобива магистърска степен по биология на развитието, като разработва тема свързана с ролята на естествените регулаторни Т клетки при бременността.

Румяна е участвала с резултати в 10 научни форуми, от които в 4 е имала устни презентации. Тя е участвала в 3 научни проекта и е била ръководител на един научен проект със заглавие „Значение на експресията на Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) за фенотипната характеристика и функционалния капацитет на естествените регулаторни Т-клетки като основа за поддържане на Т-клетъчния имунен толеранс“, подчертаващ нейните умения за работа в екип и самостоятелност.

Професионалната ѝ кариера включва работа в няколко водещи медицински центъра и лаборатории, включително Института по биология и имунология на размножаването при БАН, Synlab България, Repro Inova, Аджибадем Сити Клиник Токуда Болница и Специализираната болница за активно лечение по гинекология и асистирана репродукция „Д-р Малинов“. В медицинските учреждения в които работи тя се занимава и с координиране на клинични изследвания, работа в лаборатории за асистирана репродукция и водене на различни научни проекти. Тя е член на Европейското общество за репродуктивна медицина и ембриология (ESHRE), и на Българското дружество по имунология, част от Съюза на учените в България и Европейската федерация по имунологични общества (EFIS).

## 2. Актуалност на тематиката

Актуалността на тематиката, засегната в дисертационния труд на Румяна Иванова Сусуркова, е от изключителна важност в контекста на съвременните медицински и социални предизвикателства. Световната здравна организация (WHO) отчита, че приблизително 15% от населението в световен мащаб изпитва трудности с зачеването, като в България броят на двойките, страдащи от безплодие, надвишава 145 000. Въпреки напредъка в областта на асистираните репродуктивни технологии (АРТ), причините за неуспех често остават неизяснени, като при около 20% от случаите се говори за идиопатичен стерилитет. Неизяснена остава и етиологията на около 40% от случаите на повтарящи се ранни загуби на плода (преди 12 г.с.). Изясняването на идиопатичния стерилитет и ранните спонтанни аборти подчертава необходимостта от още по-задълбочено разбиране и нови научни подходи в областта на репродуктивната имунология.

Регулаторните Т-клетки (Tregs) играят ключова роля в успеха на бременността, контролирайки имунния отговор и поддържайки толерогенно състояние в организма на майката. Недостатъчният брой или функционалната недостатъчност на тези клетки се асоциира с репродуктивни неуспехи. Това представлява значителен научен интерес, тъй като при редица аутоимунни и туморни заболявания се наблюдават запазени нива на FOXP3+Tregs, но с ограничена експресия на CD25.

Научните усилия на Румяна Сусуркова са съсредоточени върху изследването на активационния потенциал на Tregs за постигане на имунологична толерантност. Чрез анализ на фенотипната характеристика и експресията на активационни молекули при жени с репродуктивни неуспехи, тя се стреми да допринесе за по-доброто разбиране на процесите, свързани с успешната репродукция. Изследванията се основават на работна хипотеза свързваща CD25, като критичен компонент на IL-2 рецептора, и имащ фундаментално значение за диференциацията и функцията на периферните регулаторни Т-клетки (Tregs), които са съществени за поддържането на имунологична толерантност по време на бременност. Наблюдаваните количествени промени в CD25+ Tregs могат да доведат до нарушения в имунотолерантната среда, необходима за успешна бременност, като така предполагат възможна връзка между дисрегулацията на тези клетки и неуспешните бременности. Поставената цел, да се изследва експресията на молекулата CD25 и активационния маркер HLA-DR върху FOXP3+ регулаторни CD4+Т клетки и свързаните с тях основни транскрипционни фактори и елементи на вътреклетъчната сигнализация (pSTAT5a и ERK1/2) при жени с репродуктивни неуспехи създава предпоставка тези изследвания да имат съществено значение за разработването на нови подходи в диагностицирането и лечението на репродуктивни проблеми, което би могло значително да подобри демографската ситуация в страната.

Този дисертационен труд представя значим принос в областта на репродуктивната имунология, като изследва взаимодействието между имунната система и репродуктивните неуспехи. Изводите от изследването подчертават, че при жени с репродуктивни неуспехи се наблюдават значителни разлики в популацията на CD25<sup>+</sup> /CD25<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> регулаторните Т-клетки, като се откроява доминирането на CD25-отрицателната фракция. Освен това, понижена повърхностна експресия на активационния маркер HLA-DR и ниските нива на активната форма на сигналната молекула pSTAT5a при тези жени подсказват промени в регулацията на имунната система, които могат да допринасят за неуспешни бременности. Също така, проучването идентифицира намален процент на mRNA ERK2<sup>+</sup> експресиращите клетки при пациентките, което предполага промени в контрола на клетъчната активация. Тези изводи са обогатени с оригинални данни, включително корелацията между CD25 и HLA-DR, както и анализа на pSTAT5a и ERK1/2 нива, които разкриват сложните механизми, засягащи имунната функция при жените с репродуктивни неуспехи. По този начин, този труд значително допринася за разбирането на имунната регулация в контекста на репродуктивните неуспехи и предоставя основа за разработването на потенциални терапевтични стратегии.

В заключение, актуалността на темата, разгледана в дисертацията на Румяна Сусуркова, е несъмнено значима. Разбирането на ролята на Tregs в контекста на репродуктивната имунология може да предложи нови перспективи и решения за проблемите на безплодието, които засягат значителен процент от населението на глобално ниво.

### **3. Познание на проблема**

Докторантката е развила научен обзор по темата в 22 страници, с 229 литературни източници, с 13 научни труда от последните 5 години и 82 труда (35%) от последните 10 години. Литературният обзор е представен под формата на подзаглавия, включващи подробна информация за понятията и теориите свързани с имунния толеранс, регулаторните Т-кл. (Tregs), тяхната тимусна онтогенеза, видовете субпопулации Tregs (nTregs, iTregs, Tr1, Treg17 и Th3), като е обърнато особено внимание на различните диференциращи и активиращи ги транскрипционни фактори, нивата на епигенетичен контрол които те имат и значението им за регулацията на тези популации. Подробно са представени и фенотипните характеристики на Tregs, структурата и регулацията на гена FOXP3 в този контекст, особено промоторния му контрол и видовете регулаторен изход. Посочени са подробно и низходящите пътища на клетъчна сигнализация и ефекторните / регулаторните цитокини които те управляват. Особено внимание е отделено на един от основните имунофенотипни маркери в това изследване – CD25, като част от рецептора за IL-2, механизмите на неговата регулация, кръстосаната му сигнализация с FOXP3 и други регулаторни транскрипционни фактори и произтичащите последици за клетъчната диференциация на Tregs. Разгледани са и имунофенотипните маркери CD127, CTLA-4, CD357, TNF, HLA-DR, Neuropilin 1, Helios в контекста на регулацията и активацията на различните субпопулации Tregs. Литературният обзор проследява и отделните контактно-зависими и контактно-независими функции на субпопулациите Tregs, в контекста на упражняваната от тях имunosупресия. Така се прави плавен преход от основните фундаментални познания за тези клетъчни субпопулации към клиничното значение на промените в тяхната регулация, диференциация и активация. Подробно е проследена и клетъчната сигнализация в тези клетки, вкл. TCR сигнален път, IL-2R сигнален път, Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5) сигнален път, Mapk (Mitogen-activated protein kinases) сигнален път. Следва въведение в т.нар. „Имунологичен парадокс на бременността“, формулиран от Нобеловият лауреат P. Medawar и по-късно доразвит в конкретни механизтични

модели от редица автори, вкл. проф. Sara Robertson, която доказва и дефинира ролята на про-активното създаване на имунен толеранс към бащините алогени в процеса на постепенно съзряване на ендометриума още преди стартиране на имплантацията. Развита е и концепцията за имунологично-обусловения инфертилитет. Обзорът, и представените резултати на 9 научни форума (4 презентации), както и младежки научни проекта с финансиране от БАН (програма ДФНП), и участието и във финансиран от ФНИ проект по темата показва задълбочено познаване на проблема. Литературният обзор е много добре илюстриран с фигури с текст на български език, силно информативни. Този дял, както и целият дисертационен труд е разписан на високо научно ниво, но съдържанието е представено лесно и достъпно, и представлява удоволствие за читателя.

#### 4. Методика на изследването

Методологията на изследването е съвременна, комплексна и мулти-дисциплинарна, като включва както имуно-фенотипизиране, идентифициране на транскрипционна активация посредством молекулярно-имунологичен метод PrimeFlow, така и флуоресцентно-активирано сортиране и последващи молекулярни методи за изследване на генна експресия.

Изследването, описано в дисертацията, включва две основни групи участници. Първата група е съставена от 54 клинично здрави раждали жени без аборти, на възраст между 23 и 39 години (контролната група). Втората група включва 54 жени с репродуктивни неуспехи, на възраст между 25 и 40 години (групата на пациентите). Участниците са дали информирано съгласие, като изследването е извършено в съответствие с Декларацията от Хелзинки. Изследванията са проведени в Институт по Биология и Имунология на Размножаването при Българската академия на науките, в колаборация с медицински центрове в София и Грац, Австрия.

Методите, използвани в изследването, включват вземане на венозна кръв от всички участници, изолиране на периферни мононуклеарни клетки (ПМНК) по стандартен протокол за градиентно центрофугиране и последващо имунофенотипизиране или клетъчни експерименти с начално магнитно сепариране на наивни nCD4 Т-лимфоцити (CD3+CD4+CD45RA+), последвано от флуоресцентно-активирано сортиране или от конфокална микроскопия и стимулация. Последвалото сортиране (FACSsorting) на CD25+ nTregs и CD25- nTregs е извършено с използване на панел от CD127, CD25, CD45RA и валидирано по експресията на FOXP3.

Проведени са две групи експерименти със стимулирани клетки за проследяване на динамиката на различни сигнални молекули и маркери на активация за да се провери активационния потенциал на Tregs: 1. Симултанно изследване на активация на STAT5 и експресия на HLA-DR. Изследването на фосфорилираната форма на вътреклетъчния STAT5 и повърхностната експресия на HLA-DR се провежда чрез *in vitro* експерименти със и без стимулация, като се използват различни стимулиращи фактори, включително IL-2 и анти-CD3/CD28. 2. Също така е проведено проучване на експресията на фосфорилираната форма на ERK1/2 върху предварително сортирани CD25- nTregs, като клетките са инкубирани в среда с добавени IL-2 и анти-CD3/CD28, като е включена и отрицателна контрола за правилно разделяне на популациите. Аналогично имунофенотипизиране и проверка на експресията на pSTAT5, pERK1/2, ERK1/2, FOXP3, HLA-DR е проведено с нестимулирани и стимулирани ПМНК, както и със сортирани стимулирани и нестимулирани nTregs. Приложен е и методът PrimeFlow, който комбинира branched-DNA технология с флоуцитометрия, и дава възможност за разграничаване на специфични клетъчни субпопулации, съдържащи едновременно до четири определени РНК



транскрипти. В случая е тествана експресията на иРНК на ERK1/2 в клетки фенотипизирани по маркерите FOXP3, CD3, CD4, CD25. Експресията на ERK1/2 е оценена и чрез конфокална имуно-флуоресцентна микроскопия при същата стратегия за изолиране и фенотипизиране на nTregs. Общо взето, стратегията на изследването е насочена към разбирането на имунологичните механизми, свързани с репродуктивния неуспех, чрез детайлно изучаване на ключови молекулни пътища и клетъчни популации в контекста на репродуктивната имунология. Методологията е детайлно описана, вкл. панели от антитела за имунофенотипизиране, PrimeFlow, имунофлуоресценция и пр. с достатъчно информация за проверка на липса на интерференция м/у флуоресцентните спектри на флуорохромиите използвани в конюгираните антитела, позволяващи пълна репродуцируемост на протоколите.

В главата "Резултати" са представени данни за фенотипна характеристика на регулаторни Т-клетки, анализ на регулаторните (FOXP3+CD25+/-) и не-регулаторни (FOXP3-CD25+/-) субпопулации Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи. Обсъдени са понижените естествени регулаторни Т-клетки при пациентки и изследване на експресията на активационния маркер HLA-DR, като е отбелязано доминирането на HLA-DR+ клетки в Tregs, nTregs и non-Tregs при раждали жени. Разгледани са също така изследванията на фосфорилиран STAT5a в регулаторните Т-клетъчни субпопулации, включително *in vitro* стимулираната експресия на pSTAT5a и HLA-DR, отразяваща вариации на %pSTAT5a+ клетки в 25+Tregs и 25-Tregs между раждали и нараждали жени. Разгледани са стимулационният *in vitro* модел, отразяващ промяната на %HLA-DR+ клетки в 25+Tregs и 25-Tregs, и изследването на ERK1/2+ клетки при жени с репродуктивни неуспехи. Представен е сравнителен анализ на pERK1/2+ клетки в 25+Tregs и 25-Tregs, както и по-малкият процент на ERK2 (MAPK1) експресиращи Tregs в групата на пациентите, показващ ERK2+ експресиращи клетки в изследваните групи лица. Обсъдена е също така *in vitro* стимулацията и проследяването на процента ERK1+ клетки в сортирани CD25 негативни CD45RA+CD4+T клетки от здрави контроли, с посочен анализ на pERK1+ клетки (MAPK3) при стимулационен модел с IL-2.

Основните обобщения от резултатите на изследването могат да бъдат преразказани както следва: 1. *Намалени регулаторни Т-клетки при пациенти:* Резултатите показват, че при пациентките с репродуктивни неуспехи има по-нисък процент на FOXP3+ регулаторни Т-клетки (Tregs и nTregs), независимо от тяхната експресия на CD25. Това показва, че при тези пациенти може да има дефицит в клетките, отговорни за поддържането на имуноен баланс. 2. *Промени в CD25+ и CD25- популации:* Анализът на FOXP3- Т-клетките показва по-малък процент на CD25+ клетки и по-висок процент на CD25- клетки в периферната кръв при пациентки. Това предполага, че има значителни разлики в популациите на Т-клетките при пациентите в сравнение с контролната група. 3. *Намалена експресия на HLA-DR и pSTAT5a:* В групата на пациентите се наблюдава по-нисък процент на HLA-DR+ и pSTAT5a+ клетки и в CD25 положителните, и в CD25 отрицателните популации. Това показва, че има промени в активационните и сигналните механизми на регулаторните Т-клетки. 4. *Отсъствие на отговор към IL-2 стимулация:* В стимулационните експерименти беше установено, че регулаторните Т-клетки (Tregs) в групата на пациентите не развиват отговор към IL-2 самостоятелно или в комбинация с анти-CD3/CD28, независимо от времетраенето на стимулацията. 5. *Увеличена експресия на pERK1/2 и намалена ERK2 mRNA:* Процентът на pERK1/2+ клетки в двете CD25 субпопулации е по-висок при пациентките в сравнение с контролната група, докато процентът на ERK2 mRNA+ експресиращи CD25 Tregs е по-нисък. Това показва, че активацията на регулаторните Т-клетки и свързаните с тях сигнални пътища се различава значително при пациентките в сравнение с контролните субекти. Тези наблюдения предполагат, че

количествените и функционалните разлики в регулаторните Т-клетки могат да играят роля в имунопатогенезата на нарушения имуен толеранс при жените с репродуктивни неуспехи.

Може да се направи следния коментар: Намаленият процент на FOXP3+ регулаторни Т-клетки при пациентките с репродуктивни неуспехи подсказва, че имунният толеранс може да бъде нарушен поради дефицит на тези ключови клетки. Тези клетки са важни за предотвратяването на автоимунни реакции, които могат да повлияят на бременността. Различията в процентите на CD25+ и CD25- клетки между пациентките и контролната група показват, че промените в тези популации могат да допринесат за нарушения имуен толеранс и да бъдат свързани с репродуктивни неуспехи, т.к. CD25 е жизнено важен за интернализацията на IL-2 и подържаната от него имунна хомеостаза. Експериментални модели с възстановяване на CD25+ Tregs в дефицитни организми, както и инфузията на фузионен IL-2-CD25 показват огромното значение на тази двойка лиганд-рецептор. Това се подкрепя и от получените от докторантката резултати за липса на отговор на регулаторните Т-клетки към IL-2 стимулация при пациентките, подчертавайки възможността за нарушена функционалност на тези Трег клетки. Данните от транскрипцията на ERK1/2 транскриптите (PrimeFlow) показват компенсаторна позитивна регулация в контролната група при CD25- Tregs, докато при пациентките тази регулация липсва. В същото време фосфорилираната форма на ERK (pERK1/2) е по-висока при пациентките спрямо контролите и вероятно отрезвява нарушена регулация и свръх-активация на оста NF-κB, свързана с про-инфламаторни сигнали. От друга страна тя е по-ниска в CD25- Tregs контролна група, спрямо CD25+, докато подобно на iPHK нивата, няма разлика при пациентките. Пониските нива на pERK1/2 и по-високите нива на mRNA ERK1/2 при пациентките могат да бъдат и резултат на понижена активация и от там на намалена деградация на ERK1/2 (намален „turnover“), което показва, че в другата CD25+ Tregs популацията има повишена динамика на този сигнален път. Липсата на динамика при пациентките показва повишен риск от нарушен толеранс. Важно е да се обърне внимание, че т.к. изследването е проведено посредством флоуцитометрия, а не имуноблот, е възможно и двата транскрипционни фактора ERK1 (MAPK3), ERK2 (MAPK1) да бъдат замесени в тези промени, докато PrimeFlow анализът е базиран на ДНК сонда и би трябвало да е специфичен за един от двата фактора. Показаните резултати за нарушен толеранс са допълнително подкрепени от намалената експресия на HLA-DR даваща възможност за нарушен толеранс и намалено антиген-представяне на антигени, към които трябва да се формира толерогенен отговор, докато намалените нива на фосфорилиран STAT5a показват намалена чувствителност към IL-2 сигнализация. Данните от настоящото изследване надграждат други съвременни проучвания показващи разлики в експресията на FOXP3+ T-regs, както и промени в ендометриалните и периферните им популации, като насочват вниманието към важността на CD25-IL-2 пътя.

## **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Дисертационният труд е написан на 99 страници, онагледен е с 23 оригинални фигури от които 13 фигури с резултати, 8 фигури в обзор, 2 фигури в материали и методи. Трудът съдържа 13 таблици в материали и методи. Цитирани са 229 литературни източника, всички на английски език. Трудът е разписан и структуриран много добре, много лесен за четене и много разбираем. Логиката на изследването е лесно проследима, авторката е самокритична и обективна към своите и литературните данни. Главите литературен обзор, материали и методи, резултати и дискусия са разписани четливо. Получените собствени данни са значителни и достатъчни за направените изводи. Приносите на автора са в изведения идентифицираните промени в оста CD25-IL-2, допълнение от разликите в сигнализацията на pERK2/MAPK1, STAT5a, HLA-DR в

популациите на пациентките и контролната група. Подчертана е нарушената регулация на CD25-субпопулация T-regs.

Основните приноси са обобщени по следния начин: 1. Получени са оригинални данни за понижена експресия на HLA-DR върху регулаторни и нерегулаторни T-клетки при жени с репродуктивни неуспехи. 2. Установени са ниски нива на pSTAT5a и високи нива на ERK1/2 при пациентки с репродуктивни неуспехи в сравнение със здравите контроли. 3. Намерена е положителна връзка между CD25 и HLA-DR при регулаторни и нерегулаторни T-клетки, ниските нива на pSTAT5a и на ERK2 mRNA експресиращите клетки при жените с репродуктивни неуспехи. По този начин представения дисертационен труд очертава нова посока на изследване на ролята на CD25- популация T-regs в патогенезата на идиопатичния инфертилитет и рекурентните спонтанни аборти и имплантационни неуспехи. Разширен е методичния инструментариум за тези изследвания и се дефинирани стратифициращи критерии за диференциран подход при проследяването и евентуално избора на терапия.

#### **6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Резултатите са представени в дисертационен труд, автореферат и 11 научни труда на английски език, като от тях 2 са реферирани и рецензирани в Scopus публикации с импакт фактор, съгласно изискванията за развитие на академичния състав в БАН и тези на ИБИР-БАН. Касае се само за пълно текстови публикации с оригинални резултати. Приносът на докторанта в статиите с оригинални резултати е явен, т.к. е посочен като първи автор. Данните са представени и на 9 научни форума, повечето международни извън страната. По темата е спечелен научен проект за млади изследователи, финансиран по програма ДФНП на БАН.

#### **7. Автореферат**

Авторефератът е подробен, илюстративен и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд съдържа **научно-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 Института по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилниците на БАН и на Института по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че *Румяна Иванова Сусуркова* притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Имунология“, като докторант редовна форма на обучение, 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 *Румяна Иванова Сусуркова* в докторска програма по научна специалност „Имунология“, в професионално направление 4.3. Биологични науки, от областна висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика.

26.11.2023 г.

**Изготвил становището:**

проф.  
дбн

