

## СТАНОВИЩЕ

от д-р **Виктория Сарафян - Озаян**, дм, дмн,  
професор по имунология в Медицински университет – Пловдив,  
специалист по клинична имунология и по медицинска биология,  
ръководител на Катедра „Медицинска биология“  
на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен  
“доктор”

Професионално направление - *Биологически науки*  
Докторска програма - *Имунология*

**Автор:** Румяна Иванова Сусуркова, докторант в лаборатория „Репродуктивни  
ОМИКС технологии“, ИБИР „Акад. К. Братанов“, гр. София

**Тема:** “**Определяне ролята на Т-клетъчните регулаторни механизми за  
развитието на нормална бременност при човека**”

**Научен ръководител:** доц. д-р Велислава Терзиева, дм

### Общи данни

Рецензията е изготвена в изпълнение на Заповед № 104/ 11.10.2023 г. на директора на ИБИР „Акад. К. Братанов“, въз основа на представен на хартиен и електронен носител дисертационен труд в обем от 69 страници и 22 страници книгопис. Основното впечатление от дисертацията е за добре замислено и компетентно реализирано научно проучване, в хода на което докторантката е обогатила своята подготовка в областта на съвременната репродуктивна имунология.

Дисертацията е структурирана по правилата за изготвяне на дисертационен труд. В настоящия ѝ вид отделните раздели са представени, както следва: увод – 1 стр.; литературен обзор – 22 стр.; цел и задачи – 1 стр.; материал и методи – 12 стр.; резултати – 19 стр.; дискусия – 16 стр.; изводи – 1 стр.; приноси – 1 стр. и цитирани 229 литературни източници на 22 стр. Работата е илюстрирана с 23 фигури и 6 таблици.

### **Актуалност на тематиката**

Високата честотата на репродуктивните проблеми в национален и световен мащаб, все още високият процент на инфертилитет с неизяснена генеза и неуспехът при много от асистираните репродукции определят темата на дисертационния труд като навременна и актуална.

Въпреки очевидният напредък на съвременните асистираните репродуктивни технологии, все още има много неясни въпроси, свързани с участието на имунната система в хода на бременността.

Настоящата дисертация е продължение на дългогодишните търсения на ръководения от доц. В. Терзиева екип за изясняване ролята на регулаторните Т-клетки (Tregs) в имунологичната толерантност при бременност. Този път усилията са насочени към фенотипна характеристика на периферните Tregs, анализ на експресията на активационни молекули и на свързаните с тях сигнални пътища.

Несъмнено резултатите от този фундаментален по своя характер труд имат и клинични перспективи и са пример за транслационна наука.

### **Познаване на проблема**

В литературния преглед личи отлично познаване на проблема и творчески анализ на цитираната литература. Основен акцент в литературния обзор е поставен върху имунния толеранс и участието на Tregs в него. Описани са тяхната онтогенеза в тимуса, класификация и фенотипна характеристика. Обърнато е внимание на функциите на Tregs, както и на въздействието им върху прицелните клетки чрез контактно-зависим и контактно-независим механизъм. Разгледани са активацията и сигнализацията на Tregs с анализ на TCR, IL-2, Stat5, MAPK сигнални пътища.

Освен класическите постулати, разглеждащи имунологичния парадокс на бременността, е представено и участието на iTregs и nTregs и ролята им за създаването на толерогенна среда по време на бременността. На кратко са споменати и някои основни фактори, участващи в имунологично-обусловения инфертилитет.

Научната хипотеза е дефинирана логично и приема, че CD25 отрицателните Tregs имат отношение към създаване на имунотолерантна среда при бременност.

Предполага се, че количествени промени в периферните Tregs могат да са свързани с промени в експресията на основни активационни маркери и вътреклетъчни сигнални молекули.

**Целта** е ясно дефинирана и напълно съответства на съдържанието на работата. **Задачите** са формулирани конкретно. Стилът е ясен и точен, което прави много добро впечатление и очевидно е наложен от научния ръководител.

### **Материали и методи**

Таргетната група е от 108 жени в репродуктивна възраст - равен брой (n=54) контроли - клинично здрави, раждали жени без аборти и жени с репродуктивни неуспехи, в същата възрастова група. Обект на изследване са периферни мононуклеарни клетки (PBMCs).

Подробно са описани използваните методи: получаване на клетъчни популации, *in vitro* стимулиране на PBMCs, многоцветна проточна цитометрия, PrimeFlow RNA assay и имунофлуоресценция чрез конфокална микроскопия.

Предимство на дисертационния труд е съчетанието на информативна методология с оригинална научна идея. Високотехнологичният PrimeFlow метод, който комбинира branched-DNA технология с флоуцитометрия, дава възможност за разграничаване на клетъчни субпопулации, експресиращи едновременно до четири различни РНК транскрипта. Безспорно това е модерен анализ, овладян от докторантката. Друго методично предимство на труда на Р. Сусуркова е използването на имунофлуоресцентен анализ, отчетен чрез конфокална микроскопия, който визуализира морфологично nTregs клетките.

В хода на разработване на дисертацията си докторантката е доказала и умението си за екипна работа в ИБИР.

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

**Резултатите** са безспорно оригинални и са представени стегнато и информативно. Анализът на регулаторните (Foxp3+CD25+/-) и не-регулаторни (Foxp3-CD25+/-) субпопулации Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи показва по-малък процент CD25+ Tregs и non-Tregs при пациентките в сравнение с контролите. Изследваните групи не се различават по CD25- Tregs, докато CD25- non-Tregs доминират при пациентките.

Друг интересен резултат е пониженият брой естествени регулаторни Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи. При тях се откриват по-малко CD45RA+ клетки и в двете популации- CD25+nTregs и CD25-nTregs, за разлика от контролната група жени. Не се установяват разлики в CD45RA+FOXP3-CD25+ и CD45RA+FOXP3-CD25- популациите.

Резултатите са представени логично и последователно в съответствие с изясняването на научната хипотеза, което прави много добро впечатление. Като следващ етап е оценката на функционалната способност на регулаторните Т-клетки чрез анализ на активационни маркери и молекули, участващи в сигналната трансдукция. Повърхностната експресия на активационния маркер HLA-DR показва доминиране на HLA-DR+ клетки в Tregs, nTregs и non-Tregs при раждали жени.

Установените различия в повърхностната експресия на активационните молекули на регулаторните Т-клетки при пациентките насочват към изследване на някои молекули, участващи в сигналната трансдукция като STAT5. Установява се по-нисък %pSTAT5a+ клетки при пациентките в сравнение с раждалите жени в популациите: CD25+Treg, CD25-Tregs, CD25+nTregs, CD25-nTregs, CD25+non-Tregs, CD25-non-Tregs.

Значимо откритие е фактът, че при пациентките активирането на регулаторните Т-клетки се различава от това при контролите и в допълнение към количествените разлики в регулаторните популации, стоят в основата на имунопатогенезата на нарушения имунен толеранс при жените с репродуктивни неуспехи.

Тези реални и оригинални резултати са публикувани само в 2 статии. Надявам се, че авторите предвиждат скоро съобщаването им в статия в реферирано международно списание.

Изследванията по дисертацията са реализирани с подкрепата на два проекта към Фонд "Научни изследвания", което е доказателство за уменията на докторантката и научния ѝ ръководител за генерират и изпълняват научни проекти. Р. Сусуркова е спечелила и грант, с който е реализирала краткосрочна специализация в Medical University of Graz, Austria по темата на дисертацията си.

**Обсъждането** на комплексните резултати е целенасочено и задълбочено и показва отлично познаване на актуалното състояние на проблема. Макар и относително кратка, дискусиата обсъжда критично собствените резултати. Би било удачно да завършва със заключение, което да трасира бъдещите насоки в изследванията по проблема.

**Изводите** са информативни и отразяват същността на изследването. Приемам изводите от дисертационния труд като съдържание и като лично дело на докторанта. Те убедително представят резултатите на дисертацията.

**Приносите** приемам напълно и считам, че те са оригинални и достатъчни за подобен дисертационен труд.

**Библиографията** включва оптимален брой от 229 литературни източника.

**Авторефератът** е изготвен по стандартния начин и отразява коректно дисертационния труд.

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

Румяна Сусуркова е първи автор на 2 пълнотекстови научни статии в Proceeding of the Bulgarian Academy of Sciences (C. R. Acad. Bulg. Sci.) с IF 0.343 и 0.251. Приемам, че тези публикации отговарят на изискванията на ИБИР за защита на дисертационен труд за образователна и научна степен „доктор“. Определено считам, че останалата част от оригиналните резултати следва да бъдат публикувани, защото представляват интерес за международната научна общност.

Резултатите от дисертационния труд са представени на 9 форума в страната и чужбина.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на **Румяна Иванова Сусуркова** съдържа научни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника на ИБИР „Акад. Кирил Братанов“ за придобиване на образователната и научна степен “доктор”.

Поради гореизложеното, *давам своята положителна оценка* за проведеното изследване и предлагам на членовете на научното жури да присъдят

образователната и научна степен “доктор” по имунология на Румяна Иванова  
Сусуркова.

28. 10. 2023 г.

проф. д-р Виктория Сарафян, дм, дмн

**VIKTORIA  
STEPAN  
OZANYAN**

Digitally signed by  
VIKTORIA STEPAN  
OZANYAN  
Date: 2023.10.29  
18:23:07 +02'00'