



## СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Велислава Илиева Терзиева, д.м.

на дисертационен труд на тема

### **„ОПРЕДЕЛЯНЕ РОЛЯТА НА Т КЛЕТЪЧНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК “**

на Румяна Иванова Сусуркова 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, Научна специалност  
Имунология,

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

Представеният за становище дисертационен труд е фокусиран върху изключително важен медицински проблем с голямо социално значение, който въпреки сериозните постижения, остава и водещо научно предизвикателство – неуспешната бременност. Въпреки сериозния напредък постигнат през последните десетилетия, въпросът за ролята на имунологичните механизми в тези процеси все още няма отговор. Получените знания показват участието на множество клетъчни елементи и разтворими фактори в регулацията на бременността. Особен интерес през последните години предизвиква популацията на регулаторните Т клетки (Tregs). Tregs са приети като водещото ефекторно звено на имунната толерантност, която от своя страна има критично значение за осъществяване на бременността. Самата регулаторни Т клетки са хетерогенна популация. Основната част от периферните Tregs биват индуцирани под въздействие на различни фактори, вкл. цитокини, ендокринни фактори и други. Водещ момент в индуцирането на Tregs, а и като възможност те да осъществят функцията си е

вътреклетъчната сигнализация след стимулация. Проучванията върху регулаторните Т клетки са затруднени, поради отсъствието на подходящи клетъчни линии. Това обуславя до голяма степен значимостта на дисертационния труд на Румяна Сусуркова.

Второто направление, което прави настоящата разработка важна, е изследване на активацията на Tregs, като основен фактор за осъществяване функцията на тези клетки. Подобни изследвания са правени главно на животински модели и значително по-малко при хора. Има ограничени данни, които показват, че експресията на някои активационни молекули са свързани с нарушен имуноен толеранс при автоимунни състояния, при неизяснен инфертилитет и др. Връзката между имунния толеранс, сигналната каскада при активация на Tregs и бременността все още не е разработена, а това е и централния фокус на дисертацията на Румяна Сусуркова.

Въз основа на гореизложеното приемам изследвания проблем за актуален.

Аргументация на направените изследвания

Дисертантката е обосновала изследванията си в първата част – литературен обзор. В рамките на 20 страници, Румяна Сусуркова анализира подробно литературните данни (229 автора), свързани с регулаторните Т клетки, значението на имунологичната толерантност за бременността, вътреклетъчните сигнални пътища и активацията на регулаторните Т клетки. Предвид многофакторния характер на имунологично обусловения инфертилитет, коректно са представени и други възможни механизми. В самостоятелен параграф е изведена научната хипотеза, която е в основата на направените проучвания.

Цел и задачи

Целта и задачите са формулирани ясно и кратко. Те произхождат от данните в литературния обзор и от изведените научна хипотеза.

Материали и методи

Разделът обхваща 12 страници. В него се открояват две части – изследвани лица и използвани методи (с включените материали). Описанието на изследваните лица е подробно по възраст, раждания, неуспешни бременности. Впечатление прави значителния брой изследвани лица – общо 108 жени. Посочени са включващите и изключващите критерии. Силна страна на тази част от раздела е описанието на етичното направление.

Като положителна характеристика на описанието приемам самостоятелното представяне на материалите и подробното описание на работните постановки. Дисертационният труд включва класически и иновативни, съвременни методи, каквито са клетъчно сортиране на живи клетки, PrimeFlow асей и конфокална микроскопия.

Сортирането е извършено в Медицинския Университет, Грац, Австрия. Изследванията обхващат количествени показатели, функция и молекулярен анализ на намерени изменения. Статистическите подходи са представени аргументирано. Всички лабораторни методи са представени достатъчно подробно, което позволява повторението им.

## Резултати

Разделът Резултати обхваща 20 страници, 13 фигури и включва 6 подзаглавия. Подреден е логично – от фенотипните изменения до анализ на възможните причини. Общият брой изследвани лица е 108, по равно разпределени между контроли - раждали жени и пациентки с репродуктивни неуспехи. Проучена е експресията на CD25 в регулаторните и нерегулаторните Т клетки. Намерена е разлика между двете групи, изразена в намалено съотношение CD25+/CD25- и при Tregs, и при не-Tregs в групата на пациентките. Успоредно, отново в групата на пациентките, чрез класическата стратегия за фенотипен анализ, е доказана понижена фракция на естествените Tregs.

Въз основа на получените резултати, дисертанката се насочва към способността на тези клетки да бъдат активирани и следователно - функционално годни. За тази цел е изследван активационният маркер HLA-DR и две водещи молекули от вътреклетъчната сигнална каскада - STAT5 и ERK (MAPK). Представените данни показват, че пациентките с репродуктивни проблеми се различават съществено от контролите и по трите параметъра. Нещо повече, стимулацията през Т-клетъчния рецептор не води до съществени промени в пациентските клетки.

В търсене на причините за тези находки, Румяна Сусуркова използва две групи експерименти. В едната, чрез комбинация от PCR и флоуцитометрия, е намерен по-малък процент на ERK2 (MAPK1) експресиращи Tregs в групата на пациентките. Резултатите от втората група експерименти - стимулиране на сортирани живи Treg клетки от здрави контроли, е показало възможен алтернативен път на сигнализация при CD25 негативните Tregs. Тези резултати са онагледени и от данните от конфокалната микроскопия. По-голямата част от това направление е изработено в Медицинския университет - Грац, Австрия. Тъй като подобни експерименти са трудни, поради малкия брой на Tregs в периферната кръв, оценявам високо работата на дисертанката.

## Дискусия

Разделът дискусия е написан на 7 страници, стегнато и подредено. Получените резултати са обсъдени в светлината на литературните данни по отделните направления. Впечатление прави аналитичният подход на изложението. Дискусията завършва със заключение, в което са очертани и перспективите за продължаване на работата.

## Изводи



Направени са пет извода, които съответстват на получените резултати.

Въз основа на тях са изведени три приноса. Техният научно-приложен характер е видим от представените доказателства за значението на вълтреклетъчната сигнализация като фактор за отклонения в механизмите на Т-клетъчен имуен толеранс при жени с репродуктивни неуспехи.

Въпросите и препоръките съм изказала по време на работата върху темата и написването на дисертацията.

Резултатите са получени от дисертанта в хода на разработката на два национални проекта, финансирани от ФНИ и от програмата за млади учени на БАН (ръководител проект), и един международен, финансиран от Европейската федерация на имунологичните дружества.

Дисертантката е обобщила получените резултати в две публикации, на които е първи автор. И двете са в международни списания с импакт фактор. Представен е списък със девет участия в наши и международни научни форуми, от които 4 са доклади и 5 - постери. Едно от резюметата е публикувано в American Journal of Reproductive Immunology.

В заключение, представената ми за становище работа е посветена на проблем с голямо социално значение, който поддържа непрестанен научен и медицински интерес – значението на имунологичните фактори за развитието на бременността. От изложението е 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 Румяна Иванова Сусуркова.

19.11.2023 г.

София

С уважение:

доцент, д-р Велислава