

СТАНОВИЩЕ

относно:

дисертационния труд на Румяна Иванова Сусуркова, редовен докторант към лаборатория по „Репродуктивни ОМИКс технологии“, Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К.Братанов“, БАН, София, за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки и научна специалност „Имунология“ с шифър 01.06.23

Тема на дисертационния труд: **„ОПРЕДЕЛЯНЕ РОЛЯТА НА Т КЛЕТЪЧНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК “**

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

Становището е изготвено от: проф. д-р Димитрина Кирилова Димитрова-Диканарова, дм, Катедра по Биология при Медицинския Факултет на МУ – София, включена в състава на Научното жури във връзка със защитата на дисертационния труд въз основа на Заповед № 104/ 11.10.2023 г. на Директора на ИБИР-БАН - Проф.д-р С.Хайрабемян, дбн.

Становището е разработено според изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Българска академия на науките и Правилника за изискванията, условията и правилата за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К.Братанов“

Данни относно професионалното развитие на Докторанта

Румяна Иванова Сусуркова придобива Образователно-квалификационна степен „Бакалавър“ по Молекулярна Биология в Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ през 2013 г., а Образователно-квалификационната степен „Магистър“, по Биология на развитието, в Софийския университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, получава през 2015 г. През 2015 г. след спечелен конкурс постъпва като асистент в Института по Биология и Имунология на Размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН, а от 2016 година е зачислена като докторант за разработване на дисертационен труд към същия научен институт. Румяна Сусуркова има също така практическа дейност като биолог-ембриолог в Лаборатории по Репродуктивна медицина. Тя е специализирала в Медицинския университет Грац, EFIS-IL Short-term Fellowship (2019). Участвала е в разработването на 3 научни проекта, финансирани от ФНИ, а на един проект, по Програма за подпомагане на млади учени и докторанти в БАН, е ръководител на научния колектив.

Румяна Сусуркова е Член на Европейската асоциация за Човешка Репродукция и Ембриология (ESHRE) и на Българското дружество по Имунология към Съюза на Учените в България и Европейската федерация на имунологичните дружества (EFIS).

Структурата на дисертационния труд

Обсъжданият дисертационен труд е разработен на 100 страници, структуриран е с **необходимото съотношение на съставните му части и включва следните основни раздели, които са съобразени с изискванията** (включени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН и Правилника за изискванията, условията и правилата за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБИР „Акад. К.Братанов“): **Списък на използваните съкращения; Въведение** - 1 страница, **Литературен обзор** - 22 страници; **Хипотеза, Цел и задачи** – 2 стр.; **Материали и методи** -13 стр., **Резултати** - 20 стр.; **Дискусия** - 7 стр.; **Изводи** - 1 стр.; **Приноси** - 1 стр.; **Библиография, а също**

така и Списък на научните статии и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд.

Библиографската справка се основава на литературни източници с пряко отношение към дискутирания проблем. Библиографията включва 229 международни литературни източника. Цитираните трудове са на латиница. Голяма част от цитираните статии са публикувани през последните години. Резултатите, включени в дисертационния труд, са публикувани в две статии, които са в списания с импакт фактор. Материалите, свързани с дисертационния труд, са докладвани на 9 научни форуми, 5 от които са международни. Дисертационният труд е финансово подпомогнат чрез участието на докторанта в два научни проекта, един от които – по Програма за подпомагане на млади учени, чийто ръководител е Докторантът, и един, финансиран от ФНИ, МОН. Дисертацията включва илюстративен материал от 23 фигури, 3 таблици и 1 приложение.

Изложението е ясно. Показани са: причинно-следствената връзка между анализирания факти и собствени данни, както и задълбочените медико-биологични и фундаментални имунологични познания на докторанта.

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Представеният ми за становище дисертационен труд е посветен на актуални фундаментални и клинични имунологични проблеми на репродуктивната медицина, и е свързан с въпроси, отнасящи се до: имунологичната хомеостаза; значението на активационния потенциал на Tregs лимфоцити за постигане на имунологична толерантност, чрез определяне на имунофенотипната характеристика на периферните Tregs; до експресията на активационни молекули и на свързаните с тях сигнални пътища, при жени с репродуктивни проблеми.

Поставените за анализ и дискусия въпроси имат отношение към основни научни проблеми с медико-биологично, демографско и социално изражение - безплодието в човешките популации, с различна етиопатагенеза, съответно лечение и прогноза, както и развитието на нормална бременност при човека.

От безплодие страдат 10-15 % от партньорските двойки, като етиологията на инфертилитета, както и на повтарящите се ранни фетални загуби, остава при значителен процент от двойките неизяснена. В този смисъл, дисертационният труд е посветен на много важен, актуален, и комплексен проблем на Имунобиологията на размножаването. Той е и предпоставка за откриването на нови диагностични и прогностични подходи при социално значимите демографски проблеми, свързани с безплодието при човека.

Дисертационният труд е задълбочен, с фундаментален и приносен характер, и е резултат от голямо по обем, компетентно проведено изследване в областта на основни медико-биологични и клинично-имунологични проблеми.

Литературният обзор е изчерпателен съобразно темата на дисертационния труд и съдържа критичен анализ на цитираните данни. В него са представени: основните механизми на придобиване на централна и периферна имунна толерантност в хода на антиген-независимата и антиген-зависимата диференциация на имунокомпетентните клетки; основни субпопулации на Tregs лимфоцити и тяхната имунофенотипна характеристика (констелацията при експресията на *FOXP3*, *CD25*, *алфа субединицата на IL -7 рецептора*, *CTLA-4*, *рецептора за глюкокортикоид-индуцираща тумор некротизиращ фактор*, *TNF*, *Neutropilin 1*, *Helios*). Анализира е степента на експресия на *HLA-DR*, както и промяната в степента на експресия под въздействие на различни стимулационни молекули. Анализирана е също така и функцията на Tregs и механизмите им на действие чрез контактно-зависим и контактно-независим начин. Подробно са анализирани данните относно активацията и

сигнализация на Tregs посредством двустепенния модел. Особен интерес представляват и данните относно "Имунологичния парадокс на бременността", превалирането на толерогенни клетки на майчино-феталната граница и тяхната имунофенотипна характеристика през различните етапи на бременността.

В традициите на Репродуктивната биология и имунология, развивани при научните изследвания в ИБИР, са споменати и някои аспекти на имунологично-обусловеното безплодие при човека, асоциирано с производството на спермоантитела (спермоаглутиниращи), анти-овариални антитела, анти-фосфолипидни антитела, както и данни относно ролята на НК клетките при жени с репродуктивни неуспехи. Литературният обзор показва отличната общобиологична и специализирана имунологична подготовка на Докторанта.

На фона на този задълбочен литературен обзор са изведени работната хипотеза, и целите и задачите на дисертационния труд. Изказана е хипотезата, че количествени промени в регулаторната Т-клетъчна популация, определена като CD4+CD25+FOXP3+, могат да бъдат причина за неуспешна бременност. Но паралелно, в някои случаи на нарушена имунна толерантност, е намерена и друга, подобна популация, която експресира FOXP3, но не и CD25. Във връзка с което, се изказва идеята, че е възможно CD25 отрицателните Tregs да имат отношение към създаване на имунотолерантната среда, необходима за успешната бременност. Тъй като CD25 е и белег за активация на Т-клетките, се предполага, че вероятните количествени промени в периферните Tregs могат да бъдат асоциирани и с отклонения в експресията на основни активационни маркери и свързани с тях вътреклетъчни сигнални молекули.

Целта на дисертационния труд е: проучване на експресията на молекулата CD25 и на активационния маркер HLA-DR върху FOXP3+ регулаторни CD4+Тклетки, и на свързаните с тях основни транскрипционни фактори и елементи на вътреклетъчната сигнализация (pSTAT5a и ERK1/2), при жени с репродуктивни неуспехи.

Разработването на дисертационния труд включва 4, произтичащи от целта задачи, които са точно изложени. Те са свързани с: Фенотипно характеризиране на субпопулациите регулаторни и не-регулаторни Т-клетки в периферна кръв на раждали жени и пациентки с репродуктивни неуспехи; Сравнителен анализ на: повърхностната експресия на HLA-DR в CD25 положителните и CD25 отрицателните FOXP3+Treg и nTreg субпопулации между контролната група и пациентките; на вътреклетъчната експресия на pSTAT5a и ERK1/2 молекулите в CD25 положителните и CD25 отрицателните FOXP3+Treg и nTreg субпопулации между контроли и пациенти; проследяване динамиката на HLA-DR, pSTAT5a и ERK1/2 молекули в условия на *in vitro* стимулация с IL-2 при CD25 положителните и CD25 отрицателните Tregs.

Материалите и използваните методи са подбрани подходящо. Те са достатъчни по обем за достоверен качествен и количествен анализ. Всички изследвания са проведени при стриктно спазване на етичните правила за работа с пациенти. Изследвани са: контролна група от клинично здрави раждали жени, и група на пациентките с репродуктивни неуспехи, разпределени по диагнози в три подгрупи. Методичният подход е комплексен и съответства на поставените цели. Той се основава на няколко главни и взаимно допълващи се съвременни групи от методи с множество подметоди. Използвани са: методи за получаване на клетъчни популации; *In vitro* стимулация на периферни мононуклеарни клетки; Проточна цитометрия (FlowCytometry); PrimeFlow RNA assay; Конфокална микроскопия IF (имунофлуоресценция); методи за обработка на резултатите чрез специфичен софтуер и статистически анализ - количествен параметричен или непараметричен тест, както и корелационен анализ.

Описанието на методите е много точно, подробно и задълбочено, и позволява тяхното повторение от други изследователи. Включени са и три таблици с пълните данни на всички използвани антитела при приложените методи.

Описанието на собствените резултати е представено задълбочено и логично. То показва методичната подготовка на Докторанта и неговата съзнателност в работата. Изложението следва логично структурата на литературния обзор и основните задачи.

Резултатите са изложени в 9 главни раздела с подраздели, някои от които са:

1. ФЕНОТИПИНАТА ХАРАКТЕРИСТИКА на Tregs е установена чрез многоцветна проточна цитометрия.

2. АНАЛИЗ НА РЕГУЛАТОРНИТЕ (FOXP3+CD25+/-) И НЕ-РЕГУЛАТОРНИ (FOXP3-CD25+/-) СУБПОПУЛАЦИИ Т-КЛЕТКИ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ и тяхното сравнение с тези при контролната група. Докторантът установява значително по-малък процент общи регулаторни Т-клетки (CD25+Tregs) [%FOXP3+CD25+ CD4+ Т-кл.] при пациентките отколкото при контроли, а също така в контролната група от раждали жени е доказан и по-висок процент не-регулаторни, но CD25+ Т-клетки (CD25+non-Tregs), [%FOXP3-CD25+ CD4+ Т-кл.], в сравнение с пациентките.

3. ПОНИЖЕНИ ЕСТЕСТВЕНИ РЕГУЛАТОРНИ Т-КЛЕТКИ (nTregs) ПРИ ПАЦИЕНТКИТЕ.

Интрапопулационният анализ на периферните регулаторни Т-клетъчни популации показва, че при жените с успешна бременност тази популация е съставена главно от CD25+nTregs, [%CD45RA+FOXP3+CD25+CD4+ Т лимфоцити] в сравнение с пациентките, а по-нисък процент CD25-nTregs е наблюдаван в пациентската група жени.

4. ИЗСЛЕДВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА АКТИВАЦИОННИЯ МАРКЕР.

Установен е по-нисък процент Tregs и nTregs в групата на жените с репродуктивни неуспехи, а също тази група се характеризира и с понижен процент активирани HLA-DR+ клетки.

5. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФОСФОРИЛИРАН STAT5A В РЕГУЛАТОРНИТЕ Т-КЛЕТЪЧНИ СУБПОПУЛАЦИИ, като получените резултати предполагат възможни отклонения в сигнално предаване и понижен активационен капацитет на регулаторните Т-клетки при пациентките с репродуктивни неуспехи.

6. *IN VITRO* СТИМУЛИРАНА ЕКСПРЕСИЯ НА pSTAT5a И HLA-DR, като периферни мононуклеарни клетки са стимулирани с IL-2 самостоятелно или в комбинация IL-2/ с анти-CD3/CD28 за 15 до 30 минути. Резултати от стимулационните експерименти, показващи вариации в експресията на двата изследвани маркера, потвърждават разликите във възможностите за активиране на регулаторните Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи.

7. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ERK1/2+ КЛЕТКИ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ, като в групата на пациентките се установяват по-високи нива на ERK1/2 положителни клетки, заедно с по-ниски проценти на pSTAT5a+ и на HLA-DR+ клетки.

8. ПО-МАЛЪК ПРОЦЕНТ НА ERK2 (МАРК1) ЕКСПРЕСИРАЩИ Tregs В ГРУПАТА НА ПАЦИЕНТИТЕ, установено чрез PrimeFlow RNA assay.

9. *IN VITRO* СТИМУЛАЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ПРОЦЕНТА ERK1+ (Extracellular signal-regulated kinases) КЛЕТКИ В СОРТИРАНИ CD25 НЕГАТИВНИ CD45RA+CD4+Т КЛЕТКИ ОТ ЗДРАВИ КОНТРОЛИ. Резултатите показват вариациите във фенотипните различия на ERK1/2 и mRNA експресията на ERK2+, и могат да бъдат свързани с нарушения във вътреклетъчната сигнализация, като имат значение основно за супресивния капацитет на регулаторните Т-клетки при пациентки.

Получените 9 групи резултати докторантът обобщава в една обща идея, според която при пациентките се установява **по-нисък процент FOXP3+регулаторни Т-клетъчни популации (Tregs и nTregs), независимо от експресията на CD25.** Данните за FOXP3- Т-клетъчните популации показват по-нисък процент на CD25+клетки и по-висок процент на CD25-клетки в периферна кръв при пациентките. В групата на пациентките се установява по-нисък процент HLA-DR+ и pSTAT5a+клетки и в CD25 положителните, и в CD25 отрицателните фракции. В резултат на стимулационните експерименти с тези два маркера се доказва, **че Tregs в групата на пациентите не развиват отговор към IL-2 самостоятелно или комбинацията IL-2/анти-CD3/CD28 независимо от времето на инкубиране.** В групата на пациентките процентът на pERK1/2+клетки и в двете CD25 субпопулации надвишава този в контролите, а този на ERK2mRNA+ експресиращи 25Tregs е по-нисък. Тези разлики показват, че при пациентките активирането на регулаторните Т-клетки (сигналното предаване и/или повърхностна експресия на активационни маркери) се различава от това при контролите, което **предполага че Tregs, участват в имунопатогенезата на променената или нарушена имунна толерантност при пациентките с репродуктивни неуспехи.**

Анализът и обсъждането на резултатите показва уменията на дисертанта да съпоставя литературните данни, да коментира получените резултати и да прави мотивирани обобщения, основаващи се на фактологията. Илюстративният материал е с високо качество и достатъчен по обем за изпълнение на поставените задачи.

Резултати от дисертационния труд са резюмирани и обобщени аналитично във **формулираните 5 извода. Те точно отразяват получените данни и са с оригинална научно-теоретична, научно-приложна и методична стойност.**

Главните формулирани приноси на дисертационния труд са 3 и съответстват на получените резултати, като имат пряко отношение към основни медико-биологични проблеми и въпроси на репродуктивната медицина:

1. Получени са оригинални данни за понижена експресия на HLA-DR върху регулаторни и нерегулаторни Т-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 с тези стойности при здрави контроли.

3. Намерена е положителна корелация между CD25 и HLA-DR при регулаторни и нерегулаторни Т-клетки, ниските нива на pSTAT5a и на ERK2 mRNA експресиращите клетки при жените с репродуктивни неуспехи.

Тези приноси са и основа за бъдещи медико-биологични изследвания и биха имали и важно диагностични приложение.

Докторантът Румяна Иванова Сусуркова има публикационна активност, която отговаря на изискванията на Правилника за развитие на академичния състав и на нормативните документи на ИБИР, БАН - София. Представен е списък на 2 научни публикации в списания с Импакт фактор, Q3, свързани с дисертационния труд, като Докторантът е първи автор и на двата труда. Докторантът изпълнява минималните наукометрични изисквания, посочени в ЗРАСРБ, свързани с публикационната дейност. Румяна Сусуркова има 9 участия в национални и международни научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд, както и участие в четири проекта, на един от които е и ръководител. Общият брой кредитни точки, изчислен според СПРАВКАТА ЗА ПОЛУЧЕНИТЕ КРЕДИТИ ОТ ЦЕНТЪРА ЗА ОБУЧЕНИЕ НА БАН е 402, при задължителен минимум 250 точки.

Авторефератът отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и правилника за приложението му. **Нямам критични забележки.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният за становище Дисертационен труд на тема **"ОПРЕДЕЛЯНЕ РОЛЯТА НА Т КЛЕТЪЧНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК "** представлява задълбочено актуално научно изследване, посветено на фундаментални медико-биологични и клинични имунологични проблеми на репродуктивната медицина. Разработването на Дисертационният труд е свързано с въпроси, отнасящи се до: имунологичната хомеостаза; значението на активационния потенциал на Tregs лимфоцити за постигане на имунологична толерантност чрез определяне на имунофенотипната характеристика на периферните Tregs и техните субпопулации; до експресията на активационни молекули и на свързаните с тях сигнални пътища, при жени с репродуктивни проблеми. Поставените за анализ и дискусия въпроси имат отношение към основни научни проблеми не само с медико-биологично значение, но също така и с демографско, и социално изражение - безплодието в човешките популации, с различна етиопатагенеза, както и развитието на нормална бременност при човека.

Научно-изследователската работа, включена в анализирания труд, е голяма по обем и много съзнателно изпълнена от Докторанта. Резултатите са компетентно дискутирани и имат важен научно-теоретичен и научно-приложен, както и методичен приносен характер в областта на Репродуктивната биология.

Качеството и обемът на дисертационния труд, както и публикационната и научно-изследователската активност на Докторанта **Румяна Иванова Сусуркова**, напълно отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение, както и на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН, и на Правилника за изискванията, условията и правилата за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБИР „Акад. К.Братанов”, София, с оглед присъждане на образователната и научна степен „Доктор”.

Качествата на дисертационния труд, а именно: задълбоченият и изчерпателен преглед на литературните данни, актуалността и значимостта на анализиранияте проблеми, прилагането на съвременни експериментални методи, високо специфични и чувствителни тестове, оригиналността и практическото значение на приносите за фундаменталната имунология и репродуктивната биология, ми дават основание да **оценя положително дисертационния труд**. Убедено заявявам пред Уважаемите членове на Научното жури, че **Румяна Иванова Сусуркова** напълно отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки и научна специалност „Имунология” с шифър 01.06.23.

27.11.2023 г.

гр. София

Изготвил становището: 

Проф. д-р Д. Дим 