

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Емилияна Илиева Конова, д.м.

на дисертационен труд на тема

### **„ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ Т-КЛЕТКИ КАТО ФАКТОР ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК“**

на Андрей Георгиев Величков, докторант редовна форма на обучение,

отчислен с право на защита

Лаборатория по репродуктивни ОМИКс технологии,

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“, БАН

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование «Природни науки, математика и информатика»

- шифър 4, професионално направление «Биологически науки» - шифър 4.3.,

научна специалност Имунология, шифър 01.06.23

Рецензията е изготвена според 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.

#### **Оценка на актуалността на темата**

Представеният за обсъждане дисертационен труд е актуално, задълбочено и с безспорен фундаментален характер проучване в областта на репродуктивната имунология. Безплодието е медицински, социален, демографски и емоционален проблем, който засяга 10-15% от двойките в развитите страни, а приблизително в 20% от случаите, основната причина остава неустановена. Неизяснена остава етиологията и при около 40% от случаите с повтарящи се загуби на плода преди 24 г.с. Въпросите, свързани с етиопатогенезата на репродуктивните неуспехи са обект и на съвременната имунология на репродукцията. Изграждането на имуноен толеранс на майчино-феталната граница има основно значение за имплантацията на оплодената яйцеклетка и

правилното протичане на бременността, и включва синергично действие на отделни клетъчни популации и секретиранията от тях цитокини в децидуата. Централна роля в тези процеси през първия триместър имат Tregs, които, чрез своето засилено присъствие на майчино-феталната граница, упражняват контрол върху имунния отговор спрямо развиващия се фетус.

Въпреки многобройните проучвания, ненапълно изяснена остава ролята на естествените Tregs (nTregs) по време на имплантацията и през първия триместър. Актуалността на обсъждания дисертационен труд се определя от задълбоченото им проучване чрез създаване на собствен алгоритъм за фенотипен анализ, приложен за тяхното изследване и оценка при жени с репродуктивни неуспехи и здрави контроли. В този смисъл, дисертационният труд е посветен на един много съществен и актуален проблем на репродуктивната имунология, отнасящ се до механизмите на имунния толеранс по време на бременността и етиопатогенезата на имплантационната недостатъчност. Затова смятам, че дисертационният труд освен актуален, е навременен и много полезен за клиничната практика.

#### **Оценка на дисертационния труд**

Обсъжданият дисертационният труд е написан на 94 страници с оптимално съотношение на съставните му части и по общоприетия модел включва следните основни раздели: Литературен обзор (21 стр.), Цел и задачи, Материал и методи (12 стр.), Собствени резултати (14 стр.), Дискусия (10 стр.), Изводи и Приноси (2 стр.). Илюстративният материал включва 3 таблици и 16 фигури. Използвани и цитирани са 260 литературни източници, като библиографията е номерирана по азбучен ред, което е общоприетия стандарт и улеснява справките на читателя. Преобладаващата част от цитираните статии и монографични издания са публикувани през последните 10 години.

Работата започва със стегнат, целенасочен литературен обзор, осветляващ детайлно фундаменталните познания, касаещи развитието на  $\alpha\beta$ T-лимфоцитите, генезата на TRECs, произхода и супресивните механизми на Tregs и епигенетичната им регулация. Имайки пред вид, че дисертационният труд освен фундаментален, има и клиничен аспект, логично и изчерпателно в литературния обзор е включен раздел, озаглавен „Неизяснен инфертилитет, повтарящи се спонтанни аборти (ПСА) и асистирани-репродуктивни технологии (АРТ). Представени са и известните до сега фундаментални и клинични данни относно ролята на Tregs при изграждането на имунен

толеранс преди и по време на бременността. Тяхното подробно описание подчертава още повече приноса на дисертационния труд за изясняване на механизмите, водещи до отключване на толеранс при протичането на нормалната бременност при човека.

**Целта** на дисертационния труд е “проучване значението на естествените регулаторни Т-клетки за развитие на бременност при човека“. Във връзка с нея ясно и целенасочено са формулирани **4 задачи**, които обхващат задълбочено проучване и прилагане на методи, позволяващи сравнителен анализ на естествените регулаторни Т-клетки и наивните Т-клетки при здрави лица и пациентки, оценка на тимусната функция и постстимулна пролиферация при пациентки с неизяснен инфертилитет и ролята на ендокринната среда върху генната експресия на транскрипционни гени.

Разделът за използвания **клиничен материал** включва представянето на две изследвани групи жени в репродуктивна възраст: пациентки (n=25) - жени с неизяснен инфертилитет, една част от които с неуспешни АРТ процедури (n=22) и такива с повтарящи се спонтанни аборти в 1-вия триместър (n=5). Здравите контроли (n=51) са разделени на две подгрупи - нераждали (n=17) и раждали жени (n=34). Считам, че групата на пациентите е описана непълно, не става ясно след кои изследвани известни рискови фактори за инфертилитет, същият е определен като „неизяснен“. Броят на пациентите в описаните подгрупи не е голям, което позволява представяне на повече клинична информация, която би предала по-голяма клиничната значимост на получените резултати.

**Методичният подход е комплексен и адекватен на поставената цел.** Той се основава на съвременни, високо информативни имунологични и молекулярно-генетични методи, част от тях, приложени в сътрудничество с престижни лаборатории. Методите включват: Проточна цитометрия - повърхностно и вътреклетъчно оцветяване; PrimeFlow (eBioscience™) - *in situ* хибридизационен метод, съчетаващ branched DNA технология и проточна цитометрия; TRECs анализ, извършен в „Лаборатория по цитокини и вирусни инфекции“, INSERM U1016, под ръководството на д-р Реми Шение (спечелен грант на Европейското дружество по имунология); Генетичното изследване за проследяване количествената експресия на *FOXP3* и *EZH2* („Лабораторията по молекулярна генетика“, Институт по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН) в присъствие на ин-витро стимулиращ фактор – прогестерон и in-vitro

стимулиране през Т-клетъчния рецептор, с магнитни биджета (DynaBeads, ThermoFischer). Статистическата обработка на данните е извършена с подходящи за целите на проучването програма (GraphPad Prism 7.0.) и тестове: за търсене на разлики между три групи са използвани параметричен post-hoc LSD тест (one-way ANOVA) и непараметричен post-hoc Dunn тест (Kruskal-Wallis), а за сравнението на две - Mann-Whitney U-тест; за установяването на асоциация между два отделни параметъра в групите е използван непараметричен Spearman's корелационен индекс ( $r^2$ ) последван от регресионен анализ ( $R^2$ ).

Внимание заслужава факта, че докторантът използва самостоятелно и много компетентно методичните подходи при обработването на пробите и интерпретирането на резултатите, както и при тяхната статистическа обработка.

### **Оценка на собствените резултати**

Резултатите са систематизирани на основата на 4-те зададени и логично свързани задачи, произтичащи от основната цел.

Основополагащи са резултатите от прилагане на целесъобразен флуоцитометричен подход за разграничаване на nTregs в периферията от общия регулаторен Т-клетъчен пул. Предложеният от докторанта алгоритъм за определяне на nTregs е подходящ и удобен метод за тяхното изследване не само с научни цели, но и в клиничната практика. Прилагайки алгоритъма за фенотипно определяне, докторантът установява значително по-ниски стойности на nTregs при 19 от пациентките спрямо 42 жени от здравите контроли, което предполага отклонения в имунния толеранс при пациентките. За потвърждение на направеното предположение, докторантът сравнява популациите на наивните конвенционални CD4<sup>+</sup> Т-клетки (nCD4) чрез изследване на тяхната основна субпопулация - не-регулаторни (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>) Т-клетки при пациентките и здравите контроли. Установеният значително понижен процент при пациентите спрямо контролите е още едно доказателство за променен имуен толеранс при пациентките.

Задълбочавайки своето проучване в насока изясняване етиопатогенезата на установения променен имуен толеранс при изследваните пациентки, докторантът се насочва към изследване на фактори, свързани с количествената динамика на наивните Т-клетки в периферията. Един от тях е продукцията на нови клетки, което провокира

изследване на тимусната функция и екстратимусната пролиферация чрез количествен анализ на T-cell Receptor Excision Circles (TRECs) - златният стандарт за изследване на тимусната функция и пост-тимусната Т-клетъчна пролиферация. Изследването на sjTRECs показва значително по-ниско количество при раждалите контроли в сравнение с останалите групи и липса на статистически значими различия между групата на пациентките и нераждалите контроли. Т.к. количеството на sjTRECs се повлиява предимно от промените, настъпили в периферията и в по-малка степен от тимусната функция след пубертета, докторантът прави логичното заключение за наличие на повишена Т-клетъчна пролиферация в групата на раждалите жени. Потвърждаването на тези данни продължава с допълнителен анализ на CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> клетките (nCD3), като носители на най-много TREC молекули в периферията, който установява най-висок процент на nCD3<sup>+</sup> в групата на нераждалите контроли. Последващ анализ на пролиферативната активност на наивните CD3<sup>+</sup>Т-клетки, използващ Ki67, участващ в организирането на хромозомите по време на митозата, показва значително по-високи стойности на процента на Ki67<sup>+</sup> клетки в CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> популацията при раждалите контроли в сравнение с нераждалите. При раждалите контроли, изследването установява повишен процент на Ki67<sup>+</sup> в конвенционалните и регулаторни nCD4<sup>+</sup> Т-клетки, но различията между групите не са статистически значими.

Докторантът изказва хипотезата, че вероятно съществува механизъм, отговорен за поддържането на определено количество nTregs и nCD4 в периферията, което при пациентките е нарушено. В подкрепа на тази хипотеза е последващото изследване на тимусната функция - проследяване на интратимусната пролиферация чрез анализ на Sj/ $\beta$ TRECs съотношението, който показва хетерогенно разпределение и в трите групи, високи нива при пациентките, но липса на статистическа достоверност между групите. Независимо от това, от събраните данни при проучването върху Sj/ $\beta$ TRECs, докторантът прави извода, че при пациентките се наблюдава повишена тимусна функция в сравнение с нераждалите контроли. По отношение на възрастово-зависимите различия, статистическата обработка на данните установява ясно изразена негативна корелация между възрастта на пациентките и количеството на sjTRECs.

С помощта на PrimeFlow, на ниво единична клетка, при ограничен брой изследвани лица, е проследена експресията на метилтрансферазата EZH2, която участва в поддържането на основните функционални особености на регулаторни и конвенционални Т-клетки. Най-високи стойности на EZH2mRNA<sup>+</sup> Tregs се установяват

при здравите нераждали контроли - двойно по-високи в сравнение с пациентките. За съжаление, малкият брой на проби в групите, не позволява приложение на сравнителен анализ за отчитане на статистически достоверни различия. Изследването на процента на  $EZH2mRNA^+FOXP3-CD4^+$ Т-клетки установява по-нисък процент при пациентките спрямо раждалите контроли, но не и спрямо нераждалите, което предполага различна функционална активност на регулаторните и конвенционални Т-клетки. Тези данни насочват към последващото изследване – оценка на промените в експресията на *EZH2* в ин-витро стимулационни модели, като получените резултати показват различна динамика в изследваните групи. Разработен от докторанта ин витро модел за изследване на вероятното директно ендокринно действие върху експресията на *EZH2* и *FOXP3* върху периферните Т-клетки използва стероидния хормон прогестерон, който има важна имуномодулаторна роля по време на бременността. Само при една от здравите раждали контроли се наблюдава значително повишена генната експресия на *EZH2* и *FOXP3*, а при нераждалите контроли се установява проба с повишена експресия на *EZH2*, но не и на *FOXP3*. Не е установена положителна промяна на изследваните гени в групата на пациентките, но присъствието на прогестерон в средата има и инхибиращ ефект върху експресия на изследваните от гени при три лица, независимо от груповата им принадлежност, което свидетелства за индивидуални различия.

Получените резултати са обстойно, обективно и критично обсъдени в **Дискусията**. Там още веднъж се обосновава причинно-следствената връзка между процесите, нарушаващи хомеостазата в периферията и необходимостта от прилагането на подходящ алгоритъм за изследване на Tregs. Анализира се предложени собствени, различен методичен алгоритъм и получените резултати се сравняват с тези на други автори, като по този начин се обективизират приносите на тази дисертация.

Основните 6 **извода** са ясно и точно формулирани и произтичат от получените собствени данни, предоставящи нови доказателства и различен подход към процесите, свързани с поддържането на имунен толеранс в периферията, свързан с бременността.

#### **Оценка на приносите**

Приносите са формулирани в 5 точки и коректно отразяват получените резултати.

**Оригинален характер** имат следните приноси:

- ❖ Използваният алгоритъм за фентотипен анализ на nTregs може да бъде използван с диагностична цел при жени с репродуктивни неуспехи от неизяснен характер.
- ❖ Получени са оригинални данни за периферната и интратимусната пролиферация посредством количествено измерване на TREC молекулите в периферна кръв при раждали жени и пациентки с неизяснен инфертилитет.
- ❖ Представени са доказателства, които подкрепят хипотезата за настъпили дълготрайни изменения в периферната Т-клетъчна популация в резултат от бременността.
- ❖ Въведен е нов методологичен подход за анализ на генната експресия на ниво единична клетка базиран на флоуцитометрия.

**Принос с потвърдителен характер:**

- ❖ Представени са доказателства за нарушен Т-клетъчен имунен толеранс при жени с неизяснен инфертилитет, вкл. ПСА.

Научната продукция на докторанта включва: 2 публикации в реферирани международни списания с общ Импакт фактор 1.664. Представени са данни за 7 участия с доклади и презентации в 3 международни и 4 български научни форуми. Докторантът е участвал в разработването на три одобрени научни проекта:

Проект № ДН03/4-2016 на Фонд "Научни изследвания,, Република България, с ръководител Доц. д-р Велислава Терзиева, дм.

Персонален грант предоставен от Европейската федерация на имунологичните дружества- Immunology letter (EFIS-IL).

Проект № ДФНП 174 по „Програма за подпомагане на младите учени в БАН –2016 г.“ (МОН).

**Заклучение:**

Оценявайки по достойнство дисертационния труд – неговата актуалност, използваните съвременни методи, получените резултати и приносите, както и професионалните и изследователски умения на докторанта, напълно убедено давам

положително становище и предлагам на Научното жури за защита на дисертационния труд също да гласува положително за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” на Андрей Георгиев Величков.

Изготвила рецензията:

Доц. Д-р Емилияна Конова, д.м.

29. 04. 2021 г.