

## РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн  
Институт по биология и имунология на размножаването  
„Акад. Кирил Братанов“ при БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

професионално направление 4.3 Биологически науки

докторска програма *Имунология*

**Автор:** *Андрей Георгиев Величков*

**Форма на докторантурата:** редовна

**Звено:** *Секция Имунобиология на размножаването / Лаборатория по репродуктивни ОМИКс технологии*

**Тема:** *ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ Т-КЛЕТКИ КАТО ФАКТОР ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК*

**Научен ръководител:** *Доц. д-р Велислава Терзиева, доктор, ИБИР-БАН*

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с изискванията на ИБИР-БАН за придобиване на ОНС „доктор“ и Правилника за развитие на академичния състав на ИБИР-БАН, като включва и изискуемите съгласно ЗРАСРБ и ППЗРАСРБ документи: Доклад до Директора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд, автобиография на докторанта, копие от диплома за висше образование, заповеди за зачисляване в докторантура, прекъсване на обучението (поради мобилност за допълнителна квалификация) и за продължаване на обучението; за отчисляване с право на защита, протокол за издържан докторантски минимум, протокол от процедура по предварително обсъждане на дисертационния труд, с предварително становище на хабилитиран учен, решение на НС за състав на НЖ, дисертационен труд, автореферат, списък на научните публикации по темата на дисертацията, копия на научните публикации, списък на участията в научни форуми, списък на забелязани цитирания.

Докторантът е приложил 2 публикации. Документите са подредени изрядно.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта**

Андрей Величков е зачислен като докторант, редовна форма на обучение през януари 2014 год., и бе отчислен с право на защита през март 2018 год., като през този период паралелно е работил като биолог в тъканна банка “Биорегенерация” ЕООД, София (до 2019). Андрей е завършил бакалавърска степен по Биология, със специалност „Молекулярна биология“ и след това магистратура по Биология, със специалност „Биохимия“, в Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, с тема на дипломната работа „Характеризиране на индуцирани плурипотентни стволови клетки получени от мастна тъкан“. Последната е разработена под ръководството също на колеги от ИБИР, секция „Молекулярна имунология“. До момента Андрей Величков има 5 професионални специализации – 3 работни срещи (workshops) по имунология - 6th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2014) 26 - 29 September 2014. Timisoara, Romania, 1st Black Sea International Immunology School (BSIIS 2014) 2 October 2014. Golden sands, Varna, 2nd Black Sea International Immunology School (BSIIS 2015) 15-17 October 2015. Sofia, и 2 по-продължителни специализации (мобилности) - Специализация в института Кошен, Париж, Франция в групата на проф. Реми Шение U1016 (2016), и Гост изследовател в Медицинския университет, Грац, Австрия под ръководството на Томас Кронейс, Dr. scient. med. От мес. октомври 2019 до момента Андрей е назначен на академична длъжност „Асистент“ в ИБИР–БАН.

За периода 2014-2019 год. Андрей Величков е демонстрирал висока мотивация за работа, много добро ниво на организация, ефективност и екипност в работата.

## **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Научната тематика на дисертационния труд и на свързаните с него посоки на изследвания е изключително актуална - в последните години се наблюдава експоненциално увеличаване на двойките с репродуктивни неуспехи от неизяснен характер на първичен инфертилитет и/или спонтанни аборти в 1-ви триместър. Разбирането на тези процеси би имало положителен ефект по отношение на социално-психологическите проблеми свързани с неуспешната бременност и евентуално биха имали положително отражение и върху демографската структура. Настоящата работа на докторанта и неговия научен ръководител е насочена към изследване на естествените регулаторни Т-клетки (nTregs) продуцирани от тимуса за поддържане на имунната хомеостаза при жени с репродуктивни неуспехи. Известно е, че nTregs са от съществено значение за поддържането на толеранс към авто-антигените и промени в техните функции биха имали отражение и към поддържания толеранс по време на бремен-

ност. Разработения дисертационен труд е актуален в и научно-приложно отношение, като поставените задачи са решени на съвременно високо-технологично ниво, с помощта на съвременни и адекватни методи. След направеното имуно-фенотипизиране на естествените регулаторни Т-клетки в периферна кръв от пациентки с неизяснен инфертилитет, е изследван техният тимусен произход и пост-тимусно развитие, с помощта на метода „T-cell receptor excision circles (TRECs)“. Изследвана е и форма на епигенетична регулация в регулаторните Т-кл. с помощта на молукулни сонди за определяне експресията на транскрипционния фактор EZH2.

#### **4. Познаване на проблема**

Докторантът е развил много сбито, но същевременно достъпно и детайлно литературния си обзор, като постъпателно въвежда нужните термини и концепции. Информацията не е претрупана, а напротив поднесена достъпно и разбираемо, което позволява и на изследовател, който не се занимава пряко с имунология да навлезе бързо и лесно в проблем, който в същото време е изключително сложен и не напълно изяснен. Много достъпно е поднесена теорията и относно TREC и епигенетичната регулация на nTregs. Материали и методи са разписани подробно, с редица обяснения, по начин позволяващ повторимост на експериментите. Резултати и дискусия са точни и ясни, направени са редица заключения, с нужното ниво на самокритична оценка. Използването на някои чуждици и специфичната стилистика, показват личен стил и самостоятелно изготвяне на текста от докторанта.

#### **5. Методика на изследването**

Избраната методика на изследване позволява ли постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

Дисертационният труд е много богат на методичен инструментариум, като отделните методи са съчетани и се надграждат, за да потвърдят и задълбочат анализа на изследваните феномени – използвани са клетъчно култивиране и стимулиране на Т-кл. рецептор, проточна флоуцитометрия за определяне на суб-популационно фенотипно разпределение, полимеразна верижна реакция – няколко разновидности, вкл. nested PCR, qPCR, и др., - за определяне на честотата на експресия на sjTREC, DJ $\beta$ TRECs, и съотношението им, както и нивата на експресия на поликомб транскрипционния фактор EZH2. Приложен е и методът Primeflow за определяне на експресията на транскриптите на поликомб транскрипционния фактор EZH2 на ниво единична клетка посредством “branched DNA technology” (многостепенна ДНК хибридизация и амплификация), която се регистрира с проточна флоуцитометрия, позволявайки мултидимензионално характеризирани на фенотипи клетки и нивата на EZH2 и РНК експе-

сия (полуколичествен). Методите са изключително модерни, актуални и адекватно използвани. Ще си позволя кратко описание на два от тях, с цел въвеждането им за по-широка аудитория, поради използването им за пръв път в научно изследване в страната:

1). Екscизионните кръгови епизомни ДНК структури, известни като „T cell receptor excision circles - TRECs“ се получават като страничен съпътстващ продукт при процеса на рекомбинация (пренареждане) на сегмента „V(D)J“ в Т-кл. рецептор и са използвани за пръв път от Дук и сътр. за проследяване на т.нар. „recent thymic emigrants“ идентифициращи продукцията на преминали селекция Т-лимфоцити. Те са стабилни през целия живот на Т-лимфоцита и корелират количествено с възрастта. TREC не подлежи на репликация и има само една бройка от него в ядрото на Т-лимфоцита напускащ тимуса, поради което популацията на TRECs се „разрежда“ с пролиферацията и диференциацията им в наивни или паметови Т-кл., т.к. попада в едната от новообразуваните при деленето две клетки. Това прави нивата на TREC в периферните Т-кл. потенциално много добри маркери за нивото на тимусната функция. Едни от най-изследваните TREC са sjTREC, които се формират по време на стадия на двойно позитивните  $\alpha\beta$ -TCR/CD3– Т-кл. Тогава повечето TCR- $\alpha$  генни локуси претърпяват пренареждане, което делетира по-голямата част от TCR- $\delta$  генния locus, който се намира между клъстерите от сегментите  $V\alpha$  и  $J\alpha$ , като се образува сигнална връзка „signal joint (sj)“ между сегментите  $\delta$ Rec и  $\psi J\alpha$ . Циркулярните ДНКи тип sjTREC съдържат делетирани сегменти  $D\delta$ ,  $J\delta$ , и  $C\delta$ . Поради пролиферацията по време на диференциацията на Т-кл. в тимуса и последващата периферна пролиферация на наивните Т-кл. се получава допълнително „разреждане“ на sjTREC, което пречи на точната оценка и корелация с централната тимусна функция. По тази причина се използва и още един вид TREC, получен преди sjTREC, по време на пренареждането на TCR- $\beta$  locus – DJ $\beta$ TRECs епизомални кръгови ДНКи подобни на sjTREC, но формирани от реаранжиране и изрязване на сегментите  $D\beta$  и  $J\beta$  преди фазата на интензивна пролиферация (преди образуването на sjTREC). По тази причина, честотата на DJ $\beta$ TRECs в двойно-позитивните тимоцити е обратно-пропорционална на броя на деленията, които тези клетки са претърпели по време на диференциацията си. Така нивото на интра-тимусна пролиферация на Т-кл. прекурсори, което е директно пропорционално на тимусната функция и продуцираните RTE, може да се определи по съотношението на образуваните sjTREC и DJ $\beta$ TREC (Дион и сътр.). Дълго време това е било сравнително трудна задача за голям обем от проби, т.к. е изисквало „nested PCR“ протокол с над 11 праймерни двойки, но работите на групата на Мануел Леал (Сара Фернандо-Мартинез и сътр.) позволяват „nested PCR“ само с 2 реакции даващи информация за двата вида циркулярна ДНК и техните съотношения.

Използваният метод в дисертационния труд е в момента „златен стандарт“ за оценка на емитираните от тимуса клетки (Recent Thymic Emigrants) и не се влияе от събитията на пролиферация в периферията. Методът позволява относително точна и бърза оценка на функцията на тимуса. За оценка на честотата на DJ $\beta$ TREC се използва оригиналният nested PCR от Дион и сътр., който е с много голям брой праймерни двойки, като би могло да се помисли за прилагането на варианта на групата на Мануел Леал, който е само с 1 двойка и е оптимизиран по-добре.

2). Методът PrimeFlow бе комерсиализиран от фирмата Agilent, и се разпространява от Thermofischer Scientific, и представлява метод основаващ се на хибридизация на сонди ДНК с прицелната иРНК за детекция, чието свързване се открива посредством разклоняваща се амплификация на ДНК (branched-DNA technology) в рамките на единична клетка, посредством флуоцитометрия, като сигналът се усилва от 8-16 хиляди пъти. Свързването на сондите се последва от свързването им с две усилващи ДНК структури (за двойка сонди), които се разклоняват в пространството и позволяват многократно усилване на сигнала. Последните се свързват с множество сонди с флуоресцентно багрило. Това е единственият метод с използването на флуоцитометрия, който може да дава информация за протеинова експресия (посредством антитела) и иРНК експресия (посредством флуоресцентни сонди).

## **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационния труд е разписан на 97 стр., като литературния обзор заема 22 стр. и има 3 фигури, материали и методи – 12 стр., резултати – 15 стр., и дискусия – 11 стр. Дисертационния труд си поставя 4 задачи, като данните са отразени в 13 фигури и са обобщени в 6 извода. За решаване на поставената цел - проучване значението на естествените регулаторни Т-клетки за развитие на бременността при човека ( и нейни отклонения) са формулирани 4 задачи - 1. Анализ на естествените регулаторни Т-клетки в периферна кръв на здрави контроли и пациентки с неизяснен инфертилитет. 2. Сравнителен анализ на наивните Т-клетки при здрави лица и пациентки. 3. Изследване на тимусната функция и посттимусната пролиферация при пациентки с неизяснен инфертилитет чрез количествен анализ на T-cell receptor excision circles (TRECs) в периферна кръв. 4. Проследяване генната експресия на EZH2 при ин-витро модели и посредством PrimeFlow в регулаторни и не-регулаторни Т-клетки. Докторантът е получил следните резултати: Сполучливо е характеризираният фенотипът на nTregs посредством стратегия за селекция на CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> FOXP3<sup>lo/+</sup> Т-кл., поради огромната хетерогенност на Treg. Изследването на nTregs при жени с неизяснен инфертилитет и спонтан-

ни аборти в 1-вия триместър показва понижение на медианата на броя им в тази група, но не и между раждали и нераждали здрави жени, което навежда авторите на мисълта да търсят връзка на тези промени в хода на бременността. При изследване на Наивните конвенционални CD4<sup>+</sup> T-клетки (nCD4) се установява подобна зависимост – значително понижен процент при жените с неизяснен инфертилитет и спонтанни аборти в 1-вия триместър спрямо нераждалите. Тези данни дават основание на докторанта и неговия научен р-л да потърсят каква е тимусната функция и екстратимусната пролиферация, като използват T-cell Receptor Excision Circles (TRECs) описан по-горе. Параметърът sjTREC е в зависимост от периферната пролиферация на наивни T-кл. и се установява, че той е намален при раждали жени спрямо жените със спонтанни аборти или нераждали контроли, което показва завишена пролиферация на тези клетки при раждалите („разреждане“). Изследване на пролиферативната активност с помощта на маркера Ki67 показва повишение именно в групата на раждалите жени по отношение на nTreg, спрямо нераждалите и спонтанните аборти. При nCD4 последните имат намалена пролиферация спрямо контролите, което показва намален капацитет за поддържане на толеранс. Докторантът след това проследява каква е ролята на интратимусната пролиферация за тези феномени, като използва анализ на Sj/βTRECs съотношението, което отразява експорта на нови T-кл., като е проследена и промяната на този индекс с възрастта. Данните показват повишен експорт на T-кл. при спонтанните аборти спрямо контролите, особено при нераждалите, като при тях има корелация показваща повишение на експорта с възрастта. При спонтанните аборти и раждалите няма такава корелация. От друга страна докторантът намира значима негативна корелация на sjTREC и възрастта при жените със спонтанни аборти, което вероятно е свързано с промени в популацията на T-кл. в периферията. Напоследък усилено се изследват епигенетичното пре-програмиране на имунните клетки като механизъм за пластичното им функционално модифициране, като един от основните механизми за това е свързан с модифициране на хистоновите протеини в нуклеозомите водещо до различна нуклеозомна заетост и промени в транскрипционните програми. Тук е избран комбиниран подход, с помощта на PrimeFlow е изследвана експресията на Polysomb транскрипционния фактор EZH2, който модифицира хистон H3, като е проследено и ин витро количествено нивото на експресия на същия в общата клетъчна популация посредством qPCR, след директна стимулация на T-кл. рецептор. Установено е, че хипометилирането на H4 и H3 може да бъде свързано с индукция на Treg фенотип. Докторантът установява потискане на експресията на EZH2 транскрипта в регулаторната субпопулация (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>)Treg при жените със спонтанни аборти за разлика от нераждалите, като процентът на тази субпопулация експресиращ този транскрипционен фактор е също най-нисък при спонтанните аборти, а най-много тези

кл. са при раждалите контроли. Теди данни показват силна функционална хетерогенност на Трег и останлите Т-кл. при бременност. Ин витро стимулация на Т-кл. рецептор при жени със спонтанни аборти и раждали показва, че при някои от първата група има потискане експресията на EZH2 и FOXP3, за разлика от раждалите където последната е увеличена, като тази експресия се влияе и от нивата на прогестерон. Авторите са изследвали допълнително и динамиката на Трег и субпопулацията nTreg (FoxP3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) с промените във възрастта и въпреки, че не намират сигнификатни разлики в процентите на тези субпопулации при жени с патология и раждали, установяват промени в CD25<sup>+</sup> между двете групи, като тези промени са били свързани с експресията на ERK 1/2. Обикновено промените в хипометилацията на гените в имунните регулаторни клетки води до такива промени в CD25, както е посочено в част от литературата.

Дискусията е много детайлна и разглежда различни хипотези обясняващи наблюдаваните феномени, като трябва да се подчертае сложната структура на Tregs, както и на nTregs. Последните могат да бъдат много пластични и да се променят фенотипно към eTregs, което допълнително усложнява изследването на феномена. В тази връзка избраният подход е много посочен и е довел до редица изводи:

1. Популацията на естествените регулаторни CD4<sup>+</sup> Т-клетки е намалена при жени с неизяснен инфертилитет.
2. При пациентките, процентът на наивните Т-клетки (nCD3<sup>+</sup>; nCD4<sup>+</sup>) в периферна кръв е понижен.
3. Значително по-ниските нива на sjTRECs, заедно с повишените Ki67+nCD3<sup>+</sup> клетки в групата на раждалите контроли показва променена пост-тимусна пролиферация на Т-лимфоцитите в сравнение с нераждалите жени.
4. При пациентките с неизяснен инфертилитет се наблюдава понижение на sjTRECs нивата с нарастване на годините, докато при нераждалите контроли положителна корелация на възрастта с sj/β TRECs.
5. Пациентките с неизяснен инфертилитет показват по-ниски стойности на EZH2-експресиращите регулаторни и не-регулаторни Т-клетки.
6. Ин-витро Т-клетъчният активационен модел показва, че ендокринната среда може да промени генната експресия на EZH2 и FOXP3 при раждалите жени.

Може да се направи извод, че нивата на пролиферация на Трег в периферията, както и функционалният им статус са много важни за протичане на успешна бременност, като вероятно повишената продукция на nTreg при спонтанните аборти е свързана с компенсаторна реакция на намалената популация в периферията.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Дисертационния труд има редица приноси, които са с научно-приложен характер, както и с методичен характер: Представени са доказателства за нарушен Т-клетъчен имунен толеранс при жени с неизяснен инфертилитет, включително тези със спонтанни аборти; Използваният алгоритъм за фентотипен анализ на pTregs 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 флуоцитометрия и DNA-branch технологията.

Направените до момента изследвания показват възможност за транслационното им приложение в оценката на спонтанните аборти и бъдеща корекция на профила на популацията на Т-регулаторни клетки в периферията с цел терапевтичното им повлияване.

## **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Публикациите по темата, включени в процедурата са в реферирани и рецензирани научни списания с импакт фактор. Резултатите са включени и отразяват част от представените данни в дисертационния труд, като са послужили и като основа за надграждане на изследванията и в редица проекти – „Проучване върху посттимусната стабилност на FOXP3 експресията за поддържане на имунологична толерантност“, Значение на EZH2, основен протеин на Поликомб комплекса, за епигенетичната регулация на FoxP3“, показващо непрекъснато търсене и задълбочаване на изследванията по проблема. Приносът на докторанта в получаване на данните и изготвянето им е явен, и съществен.

Публикациите могат да бъдат класифицирани по вид (статии – 2 броя; доклади – 4 броя), по значимост (статии в издания с импакт-фактор – 2 броя; пленарни доклади – 2 броя), по място на публикуване (статии в реферирани международни списания – 2 броя, доклади в трудове на международни научни конференции в чужбина – 3 броя; доклади в трудове на международни научни конференции в България – 3 броя; по език, на който са написани (на английски език – 6 броя).

Оценка за личното участие на докторанта в проведеното дисертационно изследване, и в каква степен формулираните приноси и получени резултати, са негова лична заслуга.

## **9. Лично участие на докторанта**



Докторанта участва изцяло в проучването, което е видно от подготвения материал и от личните ни впечатления.

### **10. Автореферат**

Авторефератът отговаря на изискванията на ИБИР и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

### **11. Критични забележки и препоръки**

На места се откриват чуждици, като в някои случаи е желателно те да бъдат преведени, за да се избегне употребата на лабораторен жаргон, напр. „бийдове“.

### **12. Лични впечатления**

Андрей Величков е изключително работлив и последователен млад изследовател и този труд е част от получените от него и научния му ръководител резултати през последните няколко години. Прави впечатление неговата интердисциплинарност и фокуса към клетъчна сигнализация в имунните клетки, което е похвално.

### **13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати**

Относно бъдещата научна работа, дисертационния труд е положил много голяма основа за такова развитие и бих препоръчал продължаване на изследванията в тази посока, както и разширяване на профилирането на nTregs по брой използвани маркери.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд *съдържа научни, научно-приложни и 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 съответния Правилник на ИБИР-БАН. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на ИБИР-БАН.

Дисертационният труд показва, че докторантът Андрей Герогиев Величков **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Имунология“ 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 Андрей Георгиев Величков в докторска програма по **Имунология**.

29.04.2021 г.

Рецензент: Сорен Хайрабедян

Проф. д-р Сорен Б. Хайрабедян, дбн