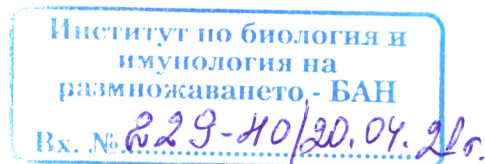


## СТАНОВИЩЕ



от доц. д-р Велислава Илиева Терзиева, 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

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 7.1 Медицина, 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 проблем с голямо социално значение, който същевременно е медицинско и научно предизвикателство – безплодие при жените. Проблемът е изследван изключително интензивно през последните десетилетия. Въпреки сериозния напредък, все още остават редица неизяснени направления. Едно от тях е имунологичното. Множество проучвания доказват значението на отделните субпопулации на имунната система за осъществяване и развитие на бременността. Акцент през последните години е популацията на регулаторните Т клетки (Tregs). Тя е един от ключовите фактори за развитие на имунотолерантна среда, необходима за протичане на бременността. Самата регулаторна популация е хетерогенна. Основната част от периферните Tregs са индуцирани под въздействие на различни фактори в околната среда, вкл. ендокринни. Съществува и една специфична фракция – естествените Tregs (nTregs), които водят началото си от тимуса, заедно с останалите Т клетки. Те преминават през специфични процеси на селекция и узряване. Значението им за установяване на имунотолерантна среда е показано при редица заболявания, свързани с променен имуноен толеранс. Проучванията върху nTregs при бременност са ограничени. Това обуславя до голяма степен значимостта на дисертационния труд на Андрей Величков.

Второто направление, което прави настоящата разработка важна, е проучване на тимусната функция като необходимо условие за развитието на естествените регулаторни Т клетки. Подобни изследвания са правени главно на животински модели и значително по-малко при хора. Известните данни са в посоката нарушен имунен толеранс при автоимунни състояния, при някои инфекциозни заболявания и др. Връзката между имунния толеранс, nTregs, тимусната функция и бременността все още не е разработена, а това е централен фокус на дисертацията на Андрей Величков.

Въз основа на гореизложеното приемам изследвания проблем за актуален.

Аргументация на направените изследвания

Дисертантът е обосновал необходимостта от изследванията си в първата част – литературен обзор. В рамките на 20 страници, г-н Величков прави подробен анализ на литературата (205 автора за период от повече от 50 години), свързана с регулаторните Т клетки, узряването на nTregs в тимуса, тимусната функция и бременността. В последния параграф са изведени научните проблеми, информацията за които е оскъдна и чието изясняване може да има съществен медицински принос.

Цел и задачи

Целта и задачите са формулирани ясно и кратко. Те произхождат от данните в литературния обзор и от изведените в последния параграф въпроси.

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 76 жени. Посочени са включващите и изключващите критерии. Силна страна на тази част от раздела е описанието на етичното направление.

Дисертационният труд се основава и на класически, и на иновативни, съвременни методи, какъвто е PrimeFlow. Изключително детайлно е представен и методът за определяне на тимусна функция чрез T-cell receptor excision circles (TRECs), овладян от дисертанта по време на специализацията му в INSERM, Париж. Разнообразието на методите показва аналитичния подход на дисертанта. 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 15 страници, 13 фигури и включва 12 подзаглавия. Подреден е логично – от фенотипните изменения до анализ на възможните причини. Общият брой изследвани лица е 76 и включва нераждали и раждали жени, и пациентки

с репродуктивни неуспехи. Дисертантът обосновава различен от класическия подход за анализ на естествените Tregs в периферна кръв. CD25, който е възприет като класически маркер за Tregs не е включен в избрания алгоритъм. Аргументацията за това е дадена в дискусията на дисертацията. Избрана е стратегия на анализ, която характеризира клетките едновременно като наивни CD4<sup>+</sup> и като регулаторни FoxP3<sup>+</sup>. От резултатите е видно, че избраният подход е обективен и приложим. Намерено е понижение на nTregs при пациентки с репродуктивни неуспехи в сравнение с раждалите и нераждалите жени, което засяга предимно nTregs. Предвид значителния брой проби, изработени и анализирани по този начин, намирам избраната стратегия за подходяща и оригинална.

С изразена научна стойност е обособяването на две групи здрави контроли – раждали жени (поне две години след раждане) и такива, които по немедицински причини не са раждали. Процентът на nTregs не се различава съществено между тях, но е значително по-висок от този, при пациентките. Това насочва към различия между здравата и пациентската група, които са потвърдени и в популацията на наивните, нерегулаторни T клетки. Поради това, дисертантът включва изследване на тимусната функция. Подобно проучване не е правено, поне според известните ми литературни данни (има една статия за sjTRECs при бременни). Използван е утвърден метод – чрез количествено определяне на T-cell receptor excision circles (TRECs).

TRECs зависят от тимусната продукция (Sj/βTRECs) и от екстратимусната пролиферация (sjTRECs). И двете направления са изследвани в трите групи. Получените резултати категорично показват, че при раждали жени sjTRECs е понижен, докато при нераждалите групи е видимо по-висок. Макар и при по-малък брой проби, са представени доказателства (Ki67<sup>+</sup> клетки), че при раждалите жени екстратимусната пролиферация е повишена. По отношение на тимусната функция, дисертантът прилага експериментален подход, усвоен по време на работата си в INSERM. Съотношението Sj/βTRECs, което е въведено като показател за оценка на вътретимусната пролиферация от проф. Реми Шение, е използвано вероятно за първи път в проучванията при жени с репродуктивни проблеми. Намерени са високи стойности при ПНИ, доста по-ниски при нераждалите жени и значителна индивидуална вариабилност. Вероятна причина за получените резултати са установените с възрастта различия в количеството на TREC молекулите при тях. Очевидно е, че тук може да се очаква влияние на ендокринни фактори. В подкрепа на това предположение е и доказаното видимо понижение на sjTRECs за кратък времеви интервал при пациентките.

При изследване причините за тези находки, Андрей Величков се спира на основен фактор за активиране на T лимфоцитите – метилтрансферазата EZH2. С помощта на иновативния PrimeFlow асей, А. Величков показва, че при пациентките се наблюдава понижен процент на експресиращите EZH2mRNA T-клетки, независимо от това дали са част от регулаторния T-клетъчен пул или не. В търсене на отговор за вероятните причини дисертантът установява, че при здравите раждали контроли експресията на EZH2 е по-чувствителна към стимулация през T-клетъчния рецептор. В представените *in vitro* модели върху въздействието на прогестерона е намерена

значителна индивидуална вариабилност. Тя може да бъде обект на бъдещи изследвания.

### Дискусия

Разделът дискусия е написан на 11 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 шест извода, които съответстват на получените резултати.

Въз основа на тях са изведени пет приноса. Четири са с научно-практически характер и представят доказателства за значението на периферната и интратимусната пролиферация като фактор за отклонения в механизмите на Т-клетъчен имуноен толеранс при жени с репродуктивни неуспехи. Един от приносите е методичен – въвеждане на PrimeFlow асей в практиката.

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.

Дисертантът е обобщил получените резултати в две публикации, на които е първи автори. И двете са в международни списания с импакт фактор. Представен е списък със шест участия в международни научни форуми, от които 2 са доклади и 4 - постери. Две от резюметата са публикувани 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 дисертантът е овладял 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 уважащото научно жури да гласува положително за присъждане на научната и образователна степен “доктор” на Андрей Георгиев Величков.

20.04.2021 г.

София

С уважение:

доцент, д-р Велислава Терзиева, дм

