

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Мария Християнова Николова, д.м.н.,
зав. Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София
на дисертационния труд на **Антония Илиева Терзиева-Караиванова**, редовен
докторант в ИБИР при БАН
на тема: **„РОЛЯ НА $\gamma\delta$ Т КЛЕТКИТЕ ПО ВРЕМЕ НА БРЕМЕННОСТТА ПРИ
ЖЕНАТА”**
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност
„Имунология”, 01.06.23

Представеният ми за становище труд е изключително актуална разработка в една сравнително млада, но с подчертано клинично и социално значение област – репродуктивната имунология. За съжаление имунологичният инфертилитет е реален проблем в съвременния свят, особен остър в страна с лоши демографски показатели като България. Същевременно имунологичните механизми и имунните клетки, които осигуряват нормалната бременност и могат да станат причина за патологични отклонения, далеч не са изяснени. Докато НК клетките са донякъде преекспонирани в стандартната имунологична практика, редица други популации на естествения и адаптивен имунитет остават не достатъчно изследвани.

Цел на настоящия труд е да запълни част от празнината в съвременните познания, като изследва ролята на неконвенционалните TCR $\gamma\delta$ + лимфоцити за осигуряване на успешна бременност. „Енигматичната“ TCR $\gamma\delta$ + популация е открита едва преди 30 г. и привлича вниманието с двойствената си природа - смесени характеристики на клетки от вродената и адаптивна имунна система, особено място в хода на имунните отговори и потенциал като обект на имунотерапевтични интервенции. Достатъчно научни факти от последните години насочват към участие на $\gamma\delta$ Т клетките при осъществяването на нормалната бременност. Следователно, докторантката и нейният научен ръководител са направили много добър и обоснован избор на тема, като имат и огромен резерв за по-нататъшното ѝ развиване: имуофизиологията на бременността е задължителна отправна точка за обяснение на нейната патология.

Дисертационният труд на А. Терзиева е представен на 123 страници, като е спазена традиционната структура: съдържание, списък на съкращенията и увод - 6 стр., анализ на литературните данни - 25 стр., цел и задачи - 1 стр, материали и методи, с приложение - 21 стр., резултати - 25 стр., обсъждане - 17 стр., изводи, приноси и библиография. Богатата библиографията включва 294 източника, от които 24 % са публикувани през последните десет години. За мен беше донякъде изненадващо, че само 5 от цитираните публикации са с водещ български автор, 4 - с водещ автор от български произход и нито една - на български език.

Уводът целенасочено въвежда в проблема. Литературният обзор е ясно структуриран и разглежда многостранно проблема за „бременността като имунологичен парадокс“, в т.ч. подлежащите анатомични структури и ангажираните популации от имунни клетки. Необходимото място е отделено на неконвенционалните $\gamma\delta$ Т клетки, като много добре са очертани особеностите им в сравнение с конвенционалните Т-клетъчни субпопулации и “смесените” им характеристики на междинно звено между естествения и придобит имунен отговор. Особено интригуваща е новата концепция за плацентобиома (в частност - L формите на BCG) и мястото на TCR $\gamma\delta$ + клетките в него - още един мотив за задълбоченото проучване именно на тази лимфоцитна субпопулация. Обзорът завършва с формулирането на хипотеза за баланса между проактивна, защитна и толерогенна, репаративна функция на $\gamma\delta$ Т клетките и логично насочва към целта на дисертацията. В тази част забележките ми са чисто технически - използвани са директно схеми от чужди източници, без превод на термините (фиг.1-5).

Задачите са изключително изчистени, като напълно съответстват на целта: характеризиране в динамика (първи и трети триместър) на количеството, субпопулационната структура, диференциацията и функционалния потенциал на TCR $\gamma\delta$ + клетките при нормална бременност. Групите, включени в изследването са логично избрани (6-12 г.с е периодът, в който толерогенните функции на TCR $\gamma\delta$ Т логично доминират, докато в края на доносената бременност може да се очаква, че те имали възможност да проявят и защитните си функции). Броят на изследваните бременни жени и контроли е достатъчен за статистически достоверни изводи и са спазени изискванията за подобен род проучвания. Използването на „чифтни образци“ - плацента и периферна кръв е ключов подход за изпълнение на поставените задачи. Струва ми се, включването на проби от периферна кръв на жени с доносена бременност не би било излишно. Използваните методи са по-скоро класически, но напълно

подходящи и осъществими за целите и мащаба на проучването, поради което вярвам, че (с изключение на капилярната гел-електофореза) докторантката ги е овладяла и изпълнявала самостоятелно.

Частта Материали и методи, заедно с Приложението за реагенти и буфери е забележително прецизно и подробно съставена и реално позволява възпроизвеждането на описаните експерименти. И тук забележките ми са технически: считате ли, че инкубацията от 15 мин. при 4°C (стр.38) е достатъчна за насищане на маркиране на изследваните от вас епитопи, при каква температура маркирахте цитоплазмни антигени (стр.40).

Резултатите са описани много стегнато, добре илюстрирани и подкрепени с коректен статистически анализ, като съответстват на всяка от поставените задачи. На практика функционалният потенциал на $\gamma\delta$ Т клетките се характеризира индиректно: по експресията на хемокинови рецептори (CCR5, CCR7) и вътреклетъчното съдържание на перфорин, както и по количествените промени в присъствие на микобактериални L-форми и репертоара на TCR $\gamma\delta$ рецепторите. Без да омаловажавам достойнствата на работата, бих препоръчала в по-нататъшните изследвания да се включат и функционални тестове (напр. спонтанна/стимулирана експресия на Th1, Th17 и регулаторни цитокини, цитотоксичност и пр.), което би направило изводите за ролята на $\gamma\delta$ Т клетките още по-убедителни. Обръщам внимание на някои неточни означения (фиг.20D „гейт на лимфоцити“, при условие, че се демонстрират Perf+NK и 2E „гейт на CD3 лимфоцити“, при условие, че се демонстрират Perf+ $\alpha\beta$ TCR+ клетки).

В класически построената дискусия всеки един от резултатите е обсъден изчерпателно и критично, в светлината на публикуваните в литературата данни, като коректно са определени резултатите с потвърдителен и приносен характер. Съгласна съм с изводите (макар че, лично аз, бих обединила 6,7 и 8, които отразяват уникалните събития на ниво майчино-фетална граница). Приемам напълно формулираните от докторантката оригинални приноси, като искам да подчертая най-съществените за мен:

- Установяването на уникален фенотипен и спектрален профил на $\gamma\delta$ Т лимфоцитите на майчино-феталната граница в периода на ранна бременност;
- Съвместяването на $\gamma\delta$ Т с активиран, ефекторен про-инфламаторен фенотип с физиологичните промени през ранната бременност като потвърждение на новаторската концепция, че успешната бременност

изисква уникална и модулирана, но не и супресирана майчина имунна система;

- Значимите отлики между характеристиките на децидуалните $\gamma\delta$ T и тези в периферната кръв през различните етапи на бременността.
- Първите наблюдения за влиянието на микобактериалните L-форми в плацентобиома на БЦЖ-ваксинирани бременни жени.

Тези приноси резултати имат пряко отношение към подходите и показателите, използвани за оценка и мониториране на жени с репродуктивни проблеми. Във връзка с формулираните приноси бих поставила следния въпрос на докторантката: Как бихте оценили широкото използване на съотношенията на имунни субпопулации в периферната кръв за оценка на репродуктивните функции в светлината на вашия извод, че „важните и интересни $\gamma\delta$ T-клетъчни имунни събития протичат на майчино-феталната граница“?

Считам, че по своето съдържание и структура авторефератът напълно отговаря на изискванията, като отразява изчерпателно и точно съдържанието на дисертацията.

В предварителната си оценка бях препоръчала авторефератът да се прегледа внимателно и коригира за някои правописни, граматически и стилистични грешки, което е направено.

Въпреки, че се запознах с докторантката за пръв път чрез нейния дисертационен труд, виждам, че е била отлична ученичка на доц Димова. Представеният труд увенчава три-годишен период на активно обучение и самостоятелна работа, участие в научни форуми и публикуване на оригинални резултати в международни научни издания с импакт фактор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за становище дисертационен труд е много навременна научна разработка в областта на репродуктивната имунология, с рационално подбран обхват на задачите, логична структура и прецизно изпълнение. Дисертацията успява да даде оригинални отговори на повечето поставени въпроси и, същевременно, да демонстрира висок потенциал за доразвиване и широко приложение в клиничната и лабораторна практика. Въз основа на всичко казано дотук, препоръчвам убедено на уважаемите членове на научното жури да присъдят образователната и научна степен “Доктор” на Антония Илиева Терзиева-Караиванова.

София, 13.06.2019 год.

РЕЦЕНЗЕНТ: