



РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Мария Иванова, дн, дбн

Специалист в областта на биологията и имунологията на репродукцията
Директор на ИБИР- БАН и ръководител на секция „Репродуктивни биотехнологии
и криобиология на гаметите”

ИБИР-БАН

Относно: Дисертационен труд по процедура за защита и присъждане на научна степен „доктор на науките”, съгласно заповед № 6 от 11.01.2016 г. и заповед 58/04.02.2016 г., с автор доц. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, дб, за нуждите на лаборатория по „Репродуктивни омикс технологии” - ИБИР, БАН.

Тема на проекта за дисертация е: „Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет”.

Научна специалност “Имунология” Шифър 01.06.23; Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки;

Данни за кариерното и научно развитие на кандидата

Доцент д-р Сорен Хайрабемян по специалност е хуманен лекар, завършил е висше образование във Висш Медицински Институт, гр. Плевен 1996 г. като магистър – лекар. От 1998 – 2001 г. работи като преподавател във ВМИ, Плевен и води курсове като асистент по „Физиология на човека и животните”. Едновременно е гост – асистент към МК в Плевен и преподава на студенти на английски език.

От 2001 г. – 2007 г. работи първоначално като биолог – специалист, по късно и като асистент и гл. асистент в секция «Молекулярна имунология» към Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов”, Българска Академия на Науките.

От 2001-2004 г. е редовен докторант към секция „Молекулярна имунология”. През 2006 г. получава степен „Доктор по имунология”. Защищава

докторска дисертация на тема: „Ангиогенни фактори и туморни маркери при ендометриоза” с научен ръководител проф. д-р Иван Кехайов.

От 2005-2007 г. продължава допълнително своето образование във Великотърновския университет „Св. Св.Кирил и Методий” и получава втора магистърска степен по „Информатика.”

От 2007-2008 г. работи като изследовател в Харвардски изследователски център, САЩ. По късно от 2010-2013 г. е назначен в ИБИР – БАН по проект Репрофорс на 7 РП като старши изследовател и работи върху проблеми на мъжката репродуктивна система и трансфер на “know-how” в областта на молекулярната биология, протеомика и биоинформатика.

От 2013 г. е доцент по научна специалност “Имунология”, Шифър 01.06.23. Неговите научни интереси са в областта на имунологията, клетъчна и молекулярна биология. Работи по редица проекти, свързани с микро РНК и туморната биология, омикс методи и анализи върху генно-регулаторни мрежи при простатна канцерогенеза, както и изследвания върху молекулярни механизми в пред-имплантационото развитие и валидиране на рецептор-лигандни взаимодействия.

От 2014 г. е научен секретар на ИБИР.

Започвайки кариерното си развитие в областта на молекулярната имунология и репродукцията, доц. Харайбедян се развива и насочва своите усилия в усвояване на нови умения и знания за научно-изследователска и фундаментална работа чрез иновативни генетични методи. Днес, доц. Хайрабедян е доказан млад учен с компетенции при изследвания със съвременни молекулярно-биологични и генетични техники, нанопотеомен и биоинформатичен анализ. Ползва свободно четири езика и особено добро впечатление прави неговата компютърна грамотност и уменията му да разработва софтуер, да прилага такива продукти в научно- изследователската си работа. Имам предвид уменията му за работа с биоинформационни продукти като микроарей експерсионни анализи, клъстерен анализ, PCI, GSEA, компютърна морфометрия колориметрия и денситометрия. Известни са неговите умения да работи с real timePCR, луминометри, флуоресцентни и УВ детектори, микроскопия, работизирани системи за извличане на ДНК/РНК и други.

Научно-изследователска дейност на доц. д-р Сорен Хайрабедян е свързана също така, с подготвяне и осъществяване на научно-изследователски проекти, както и обучение на докторанти, от които двама са от Университета Есекс, Великобритания. Ръководител е на един успешно защитил дипломант. Доц. д-р Хайрабедян има активно участие при обучение на студенти, по програми за студентски практики и като поканен лектор. Също така, доц. д-р Хайрабедян успешно ръководи и участва в редица проекти, финансирани от национални и външни за България източници - 10 броя, от които 3 са включени в конкурса.

Не на последно място доц. д-р Сорен Хайрабедян е съавтор на заявка за патент «Метод и кит за откриване на онкофузионен протеин» от 2014 г.

Доц. Д-р Сорен Хайрабедян членува в редица професионални организации, като от 2015 г. е избран за нов Председател на ММКИР.

На доц. Хайрабедян са връчени 4 научни награди - 100 Млади български учени – биографична енциклопедия, 2012, Marquis Who's Who in the World, през 2010 г. Грамота по конкурс за научни постижения на докторанти до 35 г. през 2007 г., Награда за топ публикация от Science Direct – 2005 г.

Данни за дисертационния труд, публикационната дейност, свързана с него и за наукометричните показатели на автора

За участие в настоящия конкурс доц. Сорен Хайрабедян е представил комплект от документи, съгласно изискванията на ЗРАСРБ, и правилника за приложение на закона, както и на правилника и изискванията на БАН и на „Института по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“.

Дисертационният труд е написан на 282 стр., съдържа 116 фигури и 4 таблици. Книгописът се състои от 475 литературни източника. Данните от дисертационния труд са публикувани в 12 реферирани публикации с общ импакт фактор 19.4.

Представен е автореферат, написан по изискванията на 54 страници, съдържащ обобщени данни за дисертационния труд, 39 фигури отразяващи получените резултати, изводи и приноси с оригинален характер.

Цялостната научна дейност до сега на доц. Хайрабедян обхваща 49 научни публикации с общ импакт фактор 43.3. Има 38 участия в научни форуми и общ брой на цитиранията над 150. Тези данни са в съответствие с препоръчителните

изисквания за процедура за присъждане на научна степен "Доктор на науките" на ИБИР-БАН, както и на задължителните изисквания, приети от ОС на БАН, където е оказано, че за участие в конкурс за „доктор на науките“ се изискват научни публикации с общ импакт фактор над 10 и общ брой на цитиранията над 100.

Актуалност на тематиката и познаване на проблема

Представената дисертация е основана на актуална и изключително важна научна идея, свързана с практическото решаване на глобания въпрос с мъжкия инфертилитет. Съдържа иновативност и оригиналност в подходите на проведените изследвания. Получените резултати спомагат със своя фундаментален и приносен характер за решаването на редица проблеми на нарастващия демографски срив в страната и Европа. Дисертационният труд е тясно свързан с решаването на проблема на все по изразения процент на „мъжкия фактор“, като причина за стерилитета в много млади семейства.

В последните години е особено актуален идиопатичния стерилитет, свързан с авто-спермални антители и с нарушения в сперматогенеза и клетките на Сертоли в тестиса, както и с дефекти на гени в семейството на IL-1, и клиничното наличие на IL-18 в еякулатите на мъже с доказан инфертилитет. В тази насока доц. Хайрабемян насочва своите творчески интереси като си поставя ясна и обоснована цел. Тази цел е основана на много добре обмислена идея, с която авторът се стреми да промени до някъде схващането за имунотолерантността на кръвно-тестисната бариера чрез засягане на сигналните пътища на вродения имунен отговор, инфламазомите и автофагоцитозата, като предпоставка за развитие на автоимунно-базиран инфертилитет. Бих казала, че за изпълнението на такава цел се изисква смелост и отговорност, които доц. Хайрабемян поема чрез представената докторска дисертация.

Литературният обзор е написан ясно и се чете с лекота. Авторът представя нови концепции и научни тези, които сравнява с утвърдените до сега твърдения за ролята на определени клетки и рецептори при вродения имунитет и имунологично обусловен стерилитет. Определено считам, че начина на представяне на литературния обзор от доц. д-р Хайрабемян доказва неговата висока информираност и богата палитра от знания, като те не са лишени от

самокритичност при анализите. На базата на все още нерешени проблеми той исказва своя нова теза, която е много добре обоснована и добре обмислена.

Неговото умение за аналитичност и високата му информираност подпомагат в избора на методите за провеждане на експериментите върху сигналните пътища на вродения имунен отговор, ролята на инфлазомите и автофагоцитозата за нарушаване на имунната толерантност в кръвно тестисната бариера и като резултат – проявата на автоимунно медиран стерилитет при мъже. Извършените анализи в тази посока, в които са приложени над 20 съвременни и високоинформативни метода, позволяват на доц. Хайрабемян да развие и докаже, своята идея чрез постигнати убедителни и значими резултати.

Задачи и методика на изследванията

За изпълнение на целта по дисертацията е работено по пет задачи, които са формулирани ясно и в съответствие на поставената цел.

Проведено е изследване на рецепторите на вродения имунен отговор TLR4, NOD1 и NOD2 и инфлазомният протеин NALP3 в клетки на Сертоли от мишки в пре-пубертетна и полово зряла възраст. Доц. Хайрабемян подхожда с оригиналност при първичното изолиране на клетки и Сертоли клетъчна линия 15P-1. Експресията на молекулите е проследена на РНК и протеиново ниво. Проследена е динамиката на рецепторите при стимулирането им със специфичните им лиганди. С помощта на *in vitro* модел доц. д-р Хайрабемян изследва функционалната им роля за активиране на про-инфламаторни и регулаторни цитокини в клетките на Сертоли. Проследена е и динамиката на активиране на про-инфламаторния транскрипционен фактор NFκB с помощта на специално получена Сертоли клетъчна линия, съдържаща репортерен вектор. Като краен резултат по тази задача доц. д-р Хайрабемян установява, че кръстосаното регулиране на NOD рецепторите има различна скорост и продължителност на активиране на NFκB.

В допълнение на тези данни, доц. д-р Хайрабемян използва високо информативни RT-qPCR, интрацелуларна флоуцитометрия и ELISA методи за проследяване на инфламаторния цитокин IL-1β на РНК и протеиново ниво. Анализите са направени на интрацелуларната и на секреторната форма. Авторът

установява намаляване на про-формата му след активиране на TLR4 и NOD1. Тези данни му дават основание да изкаже твърдението, че това активиране води до повишаване на нивата на NALP3, както и активиране на caspase-1 и секретиране на IL-1 β . Също така, при клетките на Сертоли доц. Хайрабедян установява модел на двустъпково активиране на NALP3 от TLR4/NOD1 и АТФ. Този модел е подобен на макрофагите и води до клетъчна смърт с активиране на caspase-1 и отделяне на про-инфламаторен IL-1 β . В заключение доц. Хайрабедян доказва, че активирането на рецепторите на вроден имунен отговор води до експресиране на цитокините IL-6 и IL-23, но не и на IL-10. В тази насока доц. Хайрабедян изказва своя хипотеза, относно как увреждането на клетките на Сертоли и специфичния цитокинов профил създават предпоставка при определени условия за насочване на наивни Т-клетки към патогенен Th17 фенотип.

Доц. Хайрабедян показва новаторски подход, като използва комбинирано използване на конфокална микроскопия със статистически анализ, с което проследява ефекта от активирането на рецепторите TLR4 и NOD1 по отношение на взаимодействията на инфлазамата NALP3 и молекулата LC3. Последната се включва в стените на активираните автофагозоми. С метода доц. Хайрабедян установява повлияване на NALP3 от TLR4 стимулирането, докато активирането на NOD1 повлиява автофагоцитозата. Тези влияния авторът потвърждава с Орбитрап нанопроотеомика с висока резолюция, транскриптомна биоинформатика и структурно молекулярно моделиране на Сертоли клетки, стимулирани по същия начин. Доказва се наличие на специфични промени в сигналните пътища, чрез количествено сравнение на експресията на 2295 протеина. Динамиката на активиране на автофагоцитозата е изследвана с помощта на клетки, трансфектирани с вектор, експресиращ тандемен двойно флуоресцентен протеин в нормални условия и такива на гладуване. В заключение доц. д-р Хайрабедян установява, че TLR4 и NOD1 предизвикват усилване на образуването на автофагозоми, като NOD1 е стимулът, необходим за сливането им с автолизозомите.

Доц. д-р Хайрабедян продължава своето изследване не само до тази изследвана система на вроден имунен отговор, а е използвал и сравнителен анализ на транскриптомни данни от макрофаги и Сертоли клетки, за

профилиране на пълния репертоар на молекулите на вродената имунна сигнализация, включително и на други инфламазомни молекули и техните адаптори. С направените количествени сравнения, доц д-р Хайрабемян показва наличие на баланс в полза на анти-апоптотично действащи молекули от семейството на инфламазомите и на слабо експресирани про-инфламаторни инфламазомни молекули в покой. На базата на тези данни е създадена хипотеза за ролята на вродената имунна сигнализация в инфертилитета.

Прави много добро впечатление логичната и последователно представяне на получените резултати и на търсенето на взаимовръзки между тях. Така доц. Хайрабемян доказва своята иновативна хипотеза за възможна „имунологична кастрация“ при някои индивиди, основана на активиране на инфламазомния сигнален път, с което се постига биологична превенция от оплождане с генетично повредени сперматозоиди. В допълнение на получените резултати е задълбочената дискусия, която на места е критична.

Изключително важно е, че освен фундаментален характер, голяма част от получените резултати има такива с практическа насоченост за репродуктивната биология. Представеният от доц д-р Хайрабемян механистичен клетъчен модел позволява да се намери отговор на много все още спорни въпроси, касаещи мъжката инфертилност.

На базата на получените резултати са формулирани 7 извода и 6 приноса с оригинален характер, които напълно отразяват получените резултати. Приемам направените изводи без резерва и считам, че те изцяло отразяват целта на дисертационния труд и потвърждават предложената хипотеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд представен от доц д-р Сорен Бохос Хайрабемян е собствена разработка с оригинален и приложен научен принос. Изяснява фундаментални механизми на патогенезата и на молекулярни регулаторни пътища за нарушаване на имунния толеранс на кръвно тестисната бариера към собствени антигени, което води до активиране на инфламазомния път за превенция от оплождане с генетично променени сперматозоиди.

На основание на представената рецензия и на моите лични впечатления за доц. д-р Сорен Хайрабедян като млад учен с изключителен талант да работи наука, да твори, да създава нови и актуални за деня теми и в същото време да носи отговорност и да има морал, да е идеалист, както и на основание на доказано получените собствените оригинални и значими за науката резултати, давам своята **положителна оценка на проведеното изследване.**

Препоръчвам на уважаемите членове на Научното Жури към ИБИР – БАН да присъди научна степен „**доктор на науките**” на доц. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дб, в Научна специалност “Имунология” Шифър 01.06.23; Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; **Професионално направление 4.3. Биологически науки.**

29.03.2016 г.

проф.д-р Мария Георгиева Иванова, дн,дбн