

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на доц. д-р Сорен Бохос Хайрабедян на тема: „Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет“ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Имунология“ (шифър 01.06.23)

Рецензент: проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Акад. Румен Цанев“ - БАН

Причините за мъжката стерилност могат да бъдат най-разнообразни. Една от тях е автоимунна реакция срещу зародишните клетки, което се доказва от откриването на анти-спермални антитела и про-възпалителни цитокини в семенната течност на мъже с репродуктивни проблеми. Дисертацията на доц. Хайрабедян е фокусирана точно върху причините за автоимунния инфертилитет при мъжете. Нейната актуалност и значение се определят от неоптимистичната прогноза на ООН, че у нас през следващите 35 години населението ще намалее с почти една трета. Разбиране в дълбочина на причините за мъжката стерилност е от ключово значение за нейната навременна диагностика, превенция и лечение.

Дисертацията е написана на 283 стр. и е оформена по стандартния начин. Включва кратък увод, литературен обзор, цел и научно-изследователски задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи, приноси с оригинален характер и библиография от 475 заглавия. Онагледена е с 116 фигури и 4 таблици. Литературният обзор обхваща приблизително 1/5 от дисертацията и е написан с вещина и задълбочено разбиране на изследваната проблематика. Фокусът е върху клетките на Сертоли, които изграждат епитела на семенните каналчета и формират кръвно-тестисната бариера. Тази бариера предпазва зреещите полови клетки с формиращите се в тях нео-антигени от евентуалната атака на професионални имунни клетки. Самите клетки на Сертоли са смятани за имunosупресори, лишени от имунни компетенции и поради това пренебрегвани в изследванията на причините за автоимунния инфертилитет. Въпросът за ролята на консерватизма в науката е спорен, но със сигурност има граница, зад която той се превръща в препъни-камък по пътя към истината. Смятам, че от подобно естество е закостенялото схващане за имунотолерантността на Сертоли клетките. Доц. Хайрабедян има смелостта да подложи на съмнение това схващане и да го провери експериментално. Разбира се, неговата смелост не е „безразсъдна“, а се основава на добро познаване на научната литература. Все повече данни сочат, че клетките на Сертоли имат поведението на фагоцитиращи и антиген-представящи клетки. Освен това „вродени“ имунни епизоди с участието на инфламазоми са наблюдавани не само в професионални имунни клетки, но и в епителни, каквито са Сертоли клетките. Така авторът си задава логичния въпрос: Проявяват ли клетките на Сертоли компетентност в областта на вродения имунитет и ако „да“ може ли подобна компетентност да бъде причина за автоимунен инфертилитет при мъжете?

Целта и задачите са ясно формулирани. Харесва ми това, че на фона на немалкия обем на дисертацията са формулирани само пет задачи, изпълнението на всяка от които е представено в отделен раздел на глава „Резултати“. Основен обект на изследване е търговска Сертоли клетъчна линия с произход от полово зрели мишки, а някои от

изследванията са провеждани и с първични клетки на Сертоли, които авторът изолира от пре-пубертетни мишки. Освен рецептора TLR4, за миши Сертоли клетки до започване на изследванията няма данни дали експресират други рецептори на вродения имунитет. Авторът прилага широк набор от най-съвременни имунологични, молекулярно-биологични и цитологични методи в своите изследвания в т. ч. количествен RT-PCR, генно заглушаване, имунофлуоресценция, нано-протеомика, проточна цитометрия и сканираща лазерна конфокална микроскопия. Провежда още *in silico* изследвания, включващи анализа на транскриптомни бази данни и молекулно моделиране, като прилага разнообразие от компютърни програми, в т. ч. собствен протокол за обработка и анализ на микроскопски изображения с висока резолюция. Намирам за изключително ценно потвърждаването на някои от резултатите чрез набор от независими методи като напр. доказване експресията на даден протеин чрез RT-PCR, проточна цитометрия, ELISA и имунофлуоресценция. Относно статистическата обработка на данните и оформянето на фигурите имам следната забележка: *На някои от фигурите не става ясно кои данни с кои са сравнявани и на графиките липсват звездички (\*) за степента на статистическа достоверност „р“, като последната фигурира само в легендите (напр. Фиг. 8). На Фиг. 13 статистическата разлика е маркирана с 4 звездички, а в легендата максималният им брой е 3 (\*\*\*) $p < 0.001$ ). Панелите на някои фигури не са обозначени (напр. Фиг. 40).*

В **първия раздел** на глава „Резултати“ се търси отговор на въпросите дали клетките на Сертоли експресират рецепторите на вродения имунитет NOD1, NOD2 и инфламазомния платформен белтък NALP3 и ако „да“ то какви са функционалните взаимоотношения между тези рецептори и водят ли те до синтезата на цитокини. Изследванията показват, че Сертоли клетките експресират и трите рецептора като NOD1- и NOD2-рецепторите проявяват кръстосана сигнализация. Наличието на функционални NOD1- и NOD2-рецептори е показано убедително, тъй като третирането на Сертоли клетките със съответните лиганди води до над 100 пъти стимулиране на транскрипцията (напр. на NOD1/ie-DAP) и над 10 пъти на транслацията (напр. на NOD2/MDP). Проведено е още изследване, в което Сертоли клетките от пре-пубертетни мишки са третирани с фоликул-стимулиращ хормон (ФСХ) и е проследена транскрипцията на NLR-рецепторите, откъдето се вижда, че тя нараства десетки пъти след стимулиране с хормона. В тази връзка имам следния въпрос: **Тъй като данните от RT-PCR са представени в относителни единици, не става ясно дали има разлика в нивата на транскрипция на NLR-рецепторите между полово зрелите и пре-пубертетните Сертоли клетки в отсъствие на лигандна стимулация. Наблюдава ли се такава голяма разлика между двата вида клетки в базалната експресията на трите рецептора, както преди и след стимулирането на пре-пубертетните Сертоли клетки с ФСХ?** Изследванията на доц. Хайрабемян показват още, че третирането на Сертоли клетки с лигандите за NOD1/NOD2 индуцира експресията на инфламазомния белтък NALP3. За по-детайлно разбиране на функционалните взаимовръзки между трите NLR-рецептора доц. Хайрабемян изследва тяхната експресия след заглушаване на *Nlrp3* (гена за NALP3) с малки интерфериращи РНКи. Така разбираме, че освен че лигандите на NOD1/NOD2 стимулират експресията на NALP3, на свой ред тяхната стимулация е *Nlrp3*-зависима. Установените взаимовръзки между NLR-рецепторите поставят въпроса за механизма, по който NOD-лигандите активират инфламазомата – дали те са директни агонисти на NALP3 или съгласно „двусигналния“ модел на инфламазомна активация участват в предварителния „прайминг“, опосредстван от NF- $\kappa$ B сигналния път. В този контекст е създадена специална Сертоли

клетъчна тест-линия, която позволява оценка на нивата на активен NF- $\kappa$ B. Действително е намерено, че третирането на клетките с двата NOD-лиганда поотделно или в комбинация стимулира синтеза на активен NF- $\kappa$ B. Въпрос: **На Фиг. 12 в легендата пише, че са представени данни за положителни контроли (мощни индуктори на NF- $\kappa$ B), а на самата фигура тези данни липсват. Поради това въпросът ми е колко мощни индуктори на NF- $\kappa$ B са ie-DAP и MDP в сравнение с положителните контроли?** Тъй като миши Сертоли клетки експресират TLR4-рецептора, доц. Хайрабедян си поставя въпроса дали неговото стимулиране (с LPS) ще индуцира експресията на ендогенните NLR-рецептори и намира, че само експресията на NALP3 е TLR4-зависима. Наличието на NALP3 както и синтеза на NF- $\kappa$ B са само предпоставки за формирането на активна инфлазама. Сигурни индикатори за наличието на функционална инфлазама са вътреклетъчното натрупване на незрялата форма на интерлевкин-1 $\beta$  (про-IL-1 $\beta$ ) и на активна каспаза-1, която процесира про-IL-1 $\beta$  до секретиремата форма IL-1 $\beta$ . Ето защо по-нататъшните изследвания на доц. Хайрабедян са фокусирани върху изследване на Сертоли клетките за тези „маркери“ на инфлазозното формиране. Получени са разнопосочни и противоречиви данни за ефекта от стимулирането на TLR4, NOD1 и NOD2, както и от заглушаването на *Nlrp3*, върху вътреклетъчното натрупване на про-IL-1 $\beta$  и секрецията на IL-1 $\beta$ . Намерено е, че IL-1 $\beta$  се секретира в отсъствие на активна каспаза-1 (след ATP-стимулиране) и обратно, условията при които е активна каспаза-1 (третиране само с MDP) далеч не са условията, при които се секретира най-много IL-1 $\beta$ . Професионализмът на доц. Хайрабедян проличава както при интерпретирането на тези резултати, така и от предприетите експерименти за тяхното обяснение. Добре известно е, че каспаза-1 е играч не само на полето на цитокиновата секреция, но и на програмираната клетъчна смърт, известна като пироптоза. Така наличието на IL-1 $\beta$  в културалната среда не е задължително да се дължи на активна секреция, а може да е резултат от пасивното му освобождаване в резултат на клетъчна смърт. Експериментите подкрепят това допускане, тъй като самостоятелното третиране на Сертоли клетките с ATP причинява висок процент клетъчна смъртност. Забележка: *Твърди се, че се наблюдава натрупване на голямо количество вътреклетъчен про-IL-1 $\beta$  при секрецията на малки количества зрял IL-1 $\beta$ . В дисертацията са представени данните от ELISA само за секрецията, но не и за вътреклетъчната експресия на цитокина. Последната е показана само чрез проточна цитометрия, но това не е достатъчно, за да добие читателят представа за отбелязаните количествени разлики.*

Основавайки се на доброто познаване на литературата, доц. Хайрабедян допуска още, че един друг клетъчен процес, автофагоцитозата, може да обясни слабата секреция на IL-1 $\beta$ . Така е направен логически преход към последвалите експерименти във втория раздел на глава „Резултати“, чиито лайтомотив е връзката между вродения имунен отговор и автофагоцитозата. В този раздел трите NLR-рецептора са изследвани за субклетъчна локализация и ко-локализация с маркери на ранната (ATG16L) и късна (LC3) автофагоцитоза чрез микроскопски методи. Степента на „фалшива“ ко-локализация, дължаща се на неспецифична реакция на вторите антители, е оценена със специален софтуер и е намерено, че тя е статистически незначима, което гарантира прецизността на проведените изследвания. Освен това, за проследяване динамиката на индивидуалните молекулни комплекси, количествена оценка на тяхната ко-компартиментализация и дистанцията им от ядрената повърхност/клетъчната мембрана е създаден специален протокол за обработка и анализ на изображения с много висока степен на резолюция,

получени с микроскопа Nikon A1R. Чрез прилагането на този протокол е намерено, че TLR4-сигнализацията води до агрегация на NALP3, но не и на NOD1-рецептора. Последният димеризира и мигрира до ядрото само при въздействие с неговия лиганд ie-DAP. Освен това, стимулирането с ie-DAP води до увеличаване размера на NALP3-агрегатите и тяхното разпръскване, което представлява вероятно начална фаза на сглобяване на инфламазома. Така ако чрез молекулярно-биологични методи авторът получава индиректна информация за формирането на активна инфлазома (синтеза на каспаза-1 и секреция на IL-1 $\beta$ ) в Сертоли клетките, то чрез микроскопските техники той „директно вижда“ нейното сглобяване. Не по-малко важно е наблюдението, че след въздействие с лигандите се наблюдава ко-локализация на NOD1 и NALP3 с маркера LC3, което е явен индикатор за преплитане на пътищата на вродения имунитет и автофагоцитозата. Потвърдителни и допълнителни данни са получени чрез прилагане на метода PCA (принципен компонентен анализ) на наблюдаваните обекти. В отделно изследване чрез инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки, след подходящо белязване на лизозомите и автофагозомите, е проследена автофагозомната динамика. Намерено е, че ефектът от стимулиране на ендогенния рецептор NOD1 е по-силен от този на активиране на TLR4 и се изразява в акумулирането на лизозоми и автофагозоми и тяхното сливане в автофаголизозоми, чиято концентрация нараства с отдалечаване от ядрото.

В третия раздел на глава „Резултати“ са представени предимно данни от протеомни и *in silico* анализи. Нано-протеомните изследвания са проведени с най-съвременна мас-спектрометрия, базирана на орбитрал-технология, чието основно предимство е високата разделителна способност, която позволява на автора да идентифицира над 2000 белтъка в изследваните клетки на Сертоли. Тук задачата е да се сравнят протеомните профили на клетки, стимулирани с лигандите на NOD1- и TLR4-рецепторите. Намерено е, че двата лиганда стимулират по различен начин автофагоцитозата и вродения имунен отговор, което потвърждава резултатите от молекулярно-имунологичните и микроскопските наблюдения. Транскриптомните данни са изключително от анализа на компютърни базирани данни, получени чрез дълбоко секвениране от ново поколение. Авторът има шанса да проведе това изследване, тъй като са публично налични „сурови“ данни за транскриптома на Сертоли клетки от две миши линии. Получена е интересна информация за експресията и на други инфлазомни платформени протеини в Сертоли клетките като NALP1, NLRC4, NALP10 и адапторните протеини ASC и AIM2, което показва, че тези клетки притежават една по-широка имунокомпетентност. В сравнение с макрофаги Сертоли клетките експресират значително по-слабо инфлазомните протеини с изключение на NALP1 (про-апоптотична инфлазома), което вероятно е механизъм за ограничаване на имунния отговор в тези непрофесионални имунни клетки. На базата на данни за първичната структура на платформения протеин NALP3 и *de novo/template*-базирано структурно моделиране, е изказана хипотеза за механизма на активация на NALP3-инфлазомата. Тук основният въпрос е за начина на автоинхибиране, тъй като изначалното (default) състояние на инфлазомите е „неактивни“. За пространствената структура на NALP3 няма експериментални данни, но са налични рентгено-кристалографски данни за NLRC4-платформения белтък. Тези данни сочат, че основни за поддържането на инфлазомата в неактивно състояние са слаби взаимодействия на АДФ с два домена в NLRC4-молекулата и нарушаването на тези взаимодействия активира инфлазомата. Сравняването на двата инфлазомни протеина подсказва сходен

механизъм на автоинхибиране на NALP3, което вероятно е по-слабо поради отсъствие на единия от АДФ-свързващите домена. Въз основа на наблюдението, че АТФ самостоятелно активира инфламазомата (секреция на IL-1 $\beta$ ) е изказано предположението, че АТФ може директно (без ко-стимулиране на NOD1/NOD2/TLR4) да активира NALP3 като измести АДФ и така наруши слабите взаимодействия, поддържащи инфламазомата в неактивно състояние. Така създаденият модел изглежда логичен и приемлив и очаква своето потвърждение (или не) в бъдещи експериментални изследвания.

Четвъртият раздел на глава „Резултати“ ни извежда извън клетките на Сертоли. Хипотезата на автора е, че активирането на вродения имунитет в Сертоли клетките води до нарушаване на кръвно-тестисната бариера, затова изследването на плътните контакти между съседни Сертоли клетки е съвсем уместно и логично. Изследвана е експресията на три белтъка, участващи в изграждането на тези контакти – клаудин 5 и 11 и оклудин след активиране на NOD1/2 рецепторите. На базата на тези изследвания може да се направи изводът, че стимулацията на NOD-рецепторите, особено на NOD1, индуцира (над 30 пъти) транскрипцията на изследваните белтъци като тази индукция е NALP3-зависима. Данните са адекватно интерпретирани в глава „Дискусия“ в смисъл, че индуцираната синтеза на протеините на плътните контакти е важна за стабилизиране на кръвно-тестисната бариера, така че през нея да не могат да преминават инфекциозни агенти, а опосредстваната от NALP3-инфламазомата секреция на IL-1 $\beta$  вероятно е необходима за паракринно (чрез IL-1 $\alpha$ ) регулиране на нейната динамика в условия на патогенна инвазия. Кумулусните клетки са разгледани като аналог на Сертоли клетките в женската репродуктивна стволова нисша. Паралелът между двата вида клетки е пренесен в случващото се в извънклетъчното пространство и се основава на а) наблюдаваното „уплътняване“ на контактите между Сертоли клетките при провокиране на вродения имунен отговор и б) литературни данни за връзката между нарушения в екстрацелуларния матрикс/клетъчните контакти и стерилността при двата пола. Използването на кумулусни клетки от здрави донори или от пациентки с първичен или вторичен инфертилитет, включени в процедури за асистирана репродукция, е добре аргументирано. Чрез количествен PCR в тези клетки са изследвани нивата на транскрипция на три гена – един кодиращ транскрипционен фактор (SOX9) с важна функция в половата диференциация и два за секретирани ензими (LOX и BSG). Почти във всички изследвани случаи е наблюдавана повишена експресия на изследваните гени при жените с репродуктивни проблеми. Въз основа на тези данни авотрът допуска възможността двата гена „да бъдат използвани като прогностичен панел за бързо определяна на овоцитната компетентия“ и разбира се изследванията в тази насока си заслужава да бъдат продължени. Клетките на Сертоли и кумулусните клетки си приличат в още по своята имунотолерантност към нео-антигените, които се формират в половите клетки в процеса на гаметогенезата. Доказана роля за поддържането на имунотолерантно състояние в зародишните и поддържащите ги клетки има клас Ib от главния комплекс на тъканната съвместимост (МНС). Експресията на молекули от този клас може да бъде модулирана от интерферон-гама (ИФН- $\gamma$ ). Доц. Хайрабедян моделира тази ситуация като третира Сертоли клетки с ИФН- $\gamma$  и действително установява засилена експресия на молекули от МНС класове I и Ib. Тази находка е дискутирана от автора в контекста на предположеното въвличане на Сертоли клетките в автоимунен отговор срещу герминативните клетки. Активирането на МНС I може да провокира клетъчен имунен отговор и пробив в имунотолерантността. Освен това в качеството си на “професионални” фагоцити при евентуалната индукция на МНС II Сертоли клетките биха могли да

представят собствени антигени, което в условията на бламирана имунотолерантност би засилило адаптивния имунен отговор. Такова допускане добре се съгласува с установената експресия на NALP10-инфламазомата в клетките на Сертоли, за която литературни данни сочат, че участва в обучението на наивни Т-клетки от APC. **Въпрос: Тъй като в инфертилни пациенти са установявани анти-спермални авто-антитела, допуска ли авторът, че Сертоли клетките в качеството си на непрофесионални APC вземат пряко участие в образуването на тези антитела или смята, че те са по-скоро резултат от активиране на професионални APC (напр. макрофаги), а защо не и директно на В-клетки, на един по-късен етап, следващ разрушаването на кръвно-тестисната бариера?**

В последния пети раздел на глава „Резултати“ е изложена хипотеза за евентуалната връзка между активиране на вродения имунен отговор в Сертоли клетките и автоимунния инфертилитет при мъжете. Представена е верига от събития, която след активиране на вродената имунна сигнализация може да доведе до разрушаване на кръвно-тестисната бариера, инфилтрация на професионални имунни клетки в огнището на възпаление и последващи вродени/адаптивни имунни реакции. Относно адаптивния имунен отговор, базирайки се на факта, че Сертоли клетките експресират IL-6 и L-23, но не и IL-10, доц. Хайрабемян предполага, че те вероятно насочват наивни Т-клетки към патогенния T<sub>H</sub>17 фенотип, който се асоциира с автоимунни заболявания. Така поставеният в началото въпрос, дали в Сертоли клетките може да се активира вродена имунна сигнализация и това да доведе до автоимунен отговор срещу герминативните клетки, получава положителен отговор. Накрая авторът ни поднася едно интересно обяснение за биологичния смисъл на „Сертолиевата“ имунокомпетентност. Вероятно имунните отговори с участието на тези клетки представляват еволюционно отработен механизъм за предпазване на генома от инвазията на вътреклетъчни патогени, с което се поддържа видовата идентичност на популационно ниво.

В глава „Дискусия“ е направен обширен и задълбочен анализ на получените резултати в контекста на огромния масив от литературни данни, което позволява на автора да направи коректни изводи и обективна самооценка на своите приноси. Приемам направените изводи и формулираните приноси, както и начинът, по който е оформен авторефератът. *Относно глава „Дискусия“ отправям забележката, че точка „Роля на клетъчното увреждане и клетъчната смърт в патологията на тестиса“ трябваше да се включи в глава „Литературен обзор“, тъй като в нея почти липсва дискусия на собствени резултати.*

Доц. Хайрабемян напълно покрива препоръчителните специфични и допълнителни изисквания на ИБИР-БАН за придобиване на научната степен „Доктор на науките“. Публикувал е общо 12 статии по темата на дисертацията с общ импакт фактор 19.4 като в 5 от публикациите е първи автор. Съавтор е и на един патент. Резултатите са представени още на 9 научни форума, от които 3 пленарни лекции и 6 постера. Научните му трудове са цитирани 151 пъти (без автоцитирания). Участвал е в общо три проекта, свързани с дисертацията, финансирани по европейски програми. Доц. Хайрабемян е получил грамота за научни постижения на докторанти на възраст до 35 години през 2006 г., а през 2012 г. заслужено е включен в енциклопедията „100 Млади български учени“.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В своя дисертационен труд доц. Хайрабедян ни предлага една оригинална научна хипотеза, която е експериментално проверена и в основата си потвърдена. Оценявам високо научната стойност на тази дисертация и широките врати, които тя отваря за не малко интересни бъдещи изследвания. Критиките ми се отнасят основно до начина на поднасяне на този интересен труд на читателя и в този смисъл са от второстепенен и маловажен характер. Наукометричните показатели на доц. Хайрабедян изцяло покриват изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, както и специфичните изисквания на ИБИР-БАН за придобиване на научната степен „Доктор на науките“. Всичко това ми дава основание убедено да дам своя положителен вот за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ на доц. д-р Сорен Бохос Хайрабедян.

25 април, 2016 г.

проф. Р. Миронова