

СТАНОВИЩЕ

за дисертационен труд на тема „Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет“ с автор Доц. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, доктор по имунология от ИБИР “Акад. Кирил Братанов” – БАН, по процедура за защита и присъждане на научната степен „Доктор на науките“, Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Науча специалност 01.06.23. “Имунология”

от проф. д-р Цветанка Цанкова Маринова, дм, дмн, Катедра „Биология, медицинска генетика и микробиология”, Медицински Факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

Дисертационният труд е актуално и оригинално по замисъл експериментално проучване с медико-биологична насоченост и научно-приложна стойност в областта на репродуктивната имунобиология, молекулярната имунология и рецепторологията. Той е посветен на много съществени, все още неизяснени и дискуссионни проблеми относно патогенезата и някои структурно-функционални характеристики на мъжкия инфертилитет. Обект на молекулярно-биологичен, имунофенотипен и рецепторен анализ са нови регулаторни механизми, ангажирани в патогенезата на мъжкия аутоимунно-базиран инфертилитет, сигнални пътища и функционални активности на системата NOD рецептори/NALP инфламазоми в клетките на Сертоли, нарушения на кръвно-тестисната бариера и нейната ангажираност в сперматогенезата с участието на инфламазомни платформени протеини.

Дисертационният труд е написан на 283 страници и е илюстриран със 116 фигури и 4 таблици. Библиографският списък включва 475 литературни източника на латиница. Литературният обзор е изчерпателен и аналитичен. В него са дискутирани най-нови данни относно ролята на различни структури, биологични процеси, лиганд-рецепторни механизми и други фактори за развитието на инфертилитет като: кръвно-тестисна бариера, NOD сигнализация, NOD протеини и автофагоцитоза, адаптивни имунни отговори, NLRP3 инфламазома, NLRP3 инфламазомно активиране и инфламазомни ефекторни механизми. Литературните данни са отлично систематизирани и компетентно интерпретирани.

Целта на дисертационния труд е да се изследва възможността за нарушаване на парадигмата за имунотолерантността на кръвно-тестисната бариера при засягане на

сигналните пътища на вродения имунен отговор, инфламазомите и автофагоцитозата, като предпоставка за развитие на автоимунно-базиран инфертилитет.

Задачите на проучването са пет. Те са ясно редактирани и се отнасят до: 1. Изследване на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2, и инфламазомният протеин NALP3 по отношение на функционалната им роля за активиране на про-инфламаторни и регулаторни цитокини в клетки на Сертоли; 2. Изследване на взаимодействия на вродената имунна сигнализация с автофагоцитозната динамика в клетки на Сертоли; 3. Характеризиране на молекулите на вродената имунна сигнализация с помощта на транскриптомни данни и молекулно моделиране, и изследване на протеомната динамика при индуциране на сигналните пътища на рецепторите TLR4 и NOD1 в клетките на Сертоли; 4. Изследване на молекули, участващи в клетъчните контакти, формирането на екстрацелуларния матрикс, както и неklasическо представяне на антигена с роля за патологията на репродуктивните стволови ниши и имуно-медиирания инфертилитет; 5. Генериране на хипотеза за ролята на вродената имунна сигнализация в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома.

Експерименталният материал е подходящ за целите на изследването. Методичният подход е комплексен и адекватен на поставената цел. Той включва набор от 20 високо информативни съвременни методи на молекулярната биология, имунология и генетика, имунохимични, имунохистохимични и статистически анализи, осигуряващи достоверност на получените резултати: 1. Клетъчно култивиране; 2. Клетъчни култури от първични клетки на Сертоли; 3. Стимулиране на рецепторите TLR4, NOD1 и NOD2 със специфичните им лиганди; 4. Генно заглушаване ("siRNA knockdown"); 5. Обратнотранскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-PCR) за Сертолиеви и кумулусни клетки; 6. Проточна цитометрия; 7. Приготвяне на протеинови екстракти от Сертолиеви и кумулусни клетки за електрофореза; 8. Електрофоретично разделяне; 9. Двумерна електрофореза (2D PAGE); 10. Orbitrap Velos нанопроотеомика; 11. Биоинформатичен анализ на транскриптомни данни, получени от дълбоко секвениране от ново поколение; 12. Имунофлуоресценция на пре-пубертетни и зрели Сертолиеви клетки; 13. Имунофлуоресцентна детекция; 14. Сканираща лазерна конфокална микроскопия; 15. Три-димензионално (3D) сегментиране и компарментализационен анализ на конфокални изображения с висока резолюция и принципен компонентен анализ на получените обекти (PCA); 16. Оценка на постоянната промяна (поток) на автофагията (Autophagic flux); 17. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA); 18. Тест за

определяне на специфичната активност на каспаза 1 (Caspase-1); 19. Продуциране на стабилна репортерна клетъчна линия; 20. Статистически анализ.

Собствените данни са обобщени в пет раздела: 1. Изследване на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2, и инфламазомния протеин NALP3 по отношение на функционалната им роля за активиране на про-инфламаторни и регулаторни цитокини в клетки на Сертоли; 2. Модулация на автофагоцитозния сигналинг по различен начин в зависимост от индукцията на вродения имунен отговор; 3. Изследване на промените във вродения имунен сигналинг индуциран при стимулация на рецепторите TLR4 и NOD1 в клетките на Сертоли; 4. Молекули участващи в клетъчните контакти, с роля за патологията на репродуктивните стволови ниши и значение за имуно-медиация инфертилитет; 5 Хипотеза за ролята на вродения имунен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома. Приложените фигури и таблици илюстрират отлично получените данни и са много компетентно интерпретирани.

Представените собствени приоритетни резултати имат главно фундаментален характер с приложно значение за медицинската практика в няколко аспекта: 1. Ролята на оста NLR рецептори/инфламазома NALP3/Caspase-1/IL-1 β в клетките на Сертоли и тяхната връзка с инфертилитета; Анализ на инфламазомната мрежа и нейното взаимодействие в клетките на Сертоли; Същност на концепцията за взаимовръзка между клетъчни увреди и имунологично-медиран инфертилитет.

Формулираните седем извода отразяват правилно получените резултати и имат научно-приложна стойност: 1. Установена е експресията на рецептори от семейството NLR на вродената имунна сигнализация в клетки на Сертоли, с кръстосано сигнализиране на рецепторите NOD1 и NOD2 вследствие стимулиране със специфичните лиганди iE-DAP и MDP, което преминава през активиране на NF- κ B и е NALP3 зависимо; 2. Лигандите на TLR4, NOD1 и NOD2 водят до свръхрегулиране на инфламазомата NALP3 и на pro-IL-1 β , активиране на каспаза-1, индуциране на секреция на IL1 β и евентуално на клетъчна смърт, както и до индукция на цитокини IL-6 и IL-23, но не и на IL-10; 3. Автофагоцитозният сигналинг е модулиран по различен начин в зависимост от индукцията на вродения имунен отговор чрез стимулация на рецепторите TLR4 или NOD1. Следвайки различно препрограмиране на клетъчния отговор, NOD1 насочва към активиране на процеса на автофагоцитоза с ускорено формиране на автофаголизозоми, докато TLR4 насочва към асемблиране на инфламазомния комплекс; 4. Протеомните данни показват, че TLR4 и NOD1 активират по различен начин

автофагозомните сигнални пътища и пътищата на вродената имунна сигнализация; 5. Анализът на транскриптомни данни показва различен набор инфламазомни молекули в клетките на Сертоли, в сравнение с макрофагите и наличие на необходимите адапторни молекули за активирането им; 6. Установено е, че стимулирането на рецепторите NOD1 и NOD2 индуцира експресията на протеините на клетъчните контакти клаудин-5, клаудин-11 и оклудин по NALP3 зависим механизъм, като заглушаването на последния потиска индукцията на клаудините; 7. Установена е ролята на вродения имунен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома, показващ патогенетичен механизъм за възникване на имуно-обусловен мъжки инфертилитет с участието на активация на инфламазомната сигнализация и превключването към патогенен адаптивен имунен отговор.

Оригиналните приноси на дисертационния труд са шест: 1. Установено е, че клетките на Сертоли, неимунни клетки от епителен произход, експресират освен NOD рецептори от семейството на вродената имунна сигнализация и една (NALP3) или повече инфламазоми, които могат да активират каспаза-1 и да продуцират проинфламаторен цитокин - IL1 β , както и да доведат до програмирана клетъчна смърт; 2. Установено е, че инфламазомният платформен протеин NALP3 има и генно-регулаторни функции, медирайки експресията на NOD1, NOD2, цитокините IL1 β , IL-6, IL-23, както и клаудините и оклудина от плътните контакти на кръвно-тестисната бариера; 3. Приложен е уникален комплексен метод за анализ, комбиниращ конфокална микроскопска триизмерна реконструкция с много висока резолюция на ко-локализиращи рецепторни и автофагозомни молекулни комплекси, с принципен компонентен анализ на всичките им морфологични параметри; 4. Установено е за първи път, че автофагоцитозния сигнален път показва индиректна чувствителност към стимулация на рецептора NOD1, чрез методите за анализ на ко-локализиращи молекулни комплекси, орбитрап протеомика с висока резолюция и анализ на автофагоцитозната динамика; 5. Установено е, че стимулирането на рецепторите на вродената имунна сигнализация потенцира експресията на протеини на клетъчните контакти, изграждащи кръвно-тестисната бариера; 6. Въз основа на получените експериментални данни е показан патогенетичен механизъм и е изказана нова хипотеза за ролята на вродения имунен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома, чрез възникване на имунолгично обусловен мъжки инфертилитет, с активация на инфламазомите и превключването към патогенен придобит имунен отговор.

Авторефератът е редактиран съгласно изискванията и коректно отразява най-съществените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

Изследователската работа на Доц. д-р Сорен Бохос Хайрабемян е много интензивна и резултатна. Научно-изследователските му интереси са главно в областта на биологията и имунологията на репродукцията и туморната биология. Списъкът на научните трудове на Доц. д-р Хайрабемян включва 50 заглавия, в това число 1 автореферат на кандидатска дисертация, две монографични издания и 47 научни публикации (Общ IF – 43.3, Цитирания – 151, h-index = 7). На научни форуми са докладвани 38 научни съобщения, като общият IF на изданията, в които са публикувани техните резюмета е 51.5.

Научните публикации, свързани с дисертационния труд са 12 (IF= 19.4). На конгреси и симпозиуми са докладвани 9 научни съобщения (IF= 14.4). Работата по дисертационния труд е финансово подпомогната от един научно-образователен и два научно-изследователски проекта.

Доц. д-р Хайрабемян е магистър по медицина. Работил е като асистент по физиология в Медицински Университет – Плевен през 1998-1999 г., а по-късно като асистент, главен асистент и доцент в ИБИР на БАН (от 2004 г. до момента). ОНС „Доктор по имунология” му е присъдена през 2006 г. след успешна защита на дисертация на тема „Ангиогенни фактори и туморни маркери при ендометриоза”. Автор е на патент. Доц. д-р Хайрабемян притежава отлични методични и изследователски умения, и значим преподавателски опит като научен ръководител на дипломанти, докторанти и преподавател на студенти. Бил е външен екзаминатор в Essex University, School of Biological Sciences, Colchester, UK и Basel University, Switzerland, както и гост-изследовател в Harvard Cutaneous Biology Research Center at Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA. Доц. д-р Сорен Хайрабемян е носител на няколко престижни награди и номинации. Той има впечатляващи научно-експертна дейност и административни активности като участник в работата на научни съвети, координатор, консултант и член на експертни комисии, участник в разработката на учебен софтуер по програма Леонардо и в подготовката на Проекти по 5 РП на ЕС – мобилност и програми Леонардо и Еразъм, и като научен секретар в ИБИР - БАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

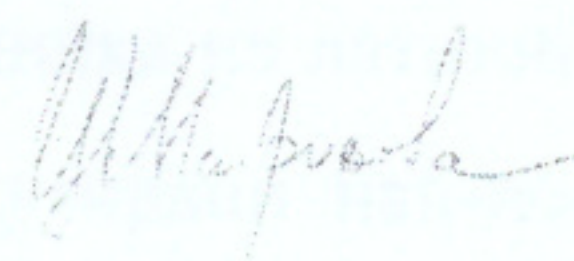
Дисертационният труд на Доц. д-р Сорен Бохос Хайрабемян е актуално и задълбочено проучване, което внася оригинални и безспорни приноси в знанията за структурно-функционалните характеристики, патогенезата и молекулните регулаторни механизми на мъжкия инфертилитет. Той има важно фундаментално и научно-приложно значение за репродуктивната имунобиология. Методичният подход е комплексен и включва съвременни и класически високо информативни анализи. Получените собствени резултати са значими, отлично документирани и анализирани. Тяхното описание е задълбочено, логично и изчерпателно. То е доказателство за отличните методична подготовка, професионална компетентност, прецизност в работата и висока ерудираност на Доц. д-р Хайрабемян.

В заключение, като отчитам качествата, научно-приложната стойност и приносния характер на рецензирания дисертационен труд „Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет“ смятам, че той отговаря напълно на изискванията на ЗНСЗ и Правилника за неговото приложение. Предлагам убедено на уважаемите членове на Научното жури да го оценят положително и да присъдят на неговия автор Доц. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, доктор по имунология научната степен „Доктор на науките“ по Научна специалност 01.06.23 “Имунология”.

26. 03. 2016 г.

гр. София

Рецензент:



(Проф. д-р Ц. Маринова, дм, дмн)