

Вх. № 4 088
18.12 2012

От проф. д-р Искра П. Алтънкова, д.м.н.

Бул. „Янко Сакъзов“ № 26
София 1504, тел: 944039

Лаборатория по клинична имунология, МБАЛ "Св. Иван Рилски",

За дисертационен труд **“Механизми за регулация на Т-клетъчния имунен отговор и клиничното им значение”** за присъждане на научна степен **“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”**,

Професионално направление: 7.1 Медицина, Научна специалност: Имунология на доц д-р Мария Християнова Николова, ДМ.

Значение и актуалност на работата

Срещата на Т лимфоцита със специфичния антиген е сигнал за сложна последователност от молекулни взаимодействия и вътреклетъчни сигнали, водещи до експресия на гени, свързани с активация, пролиферация или апоптоза. Количествените промени са съпроводени от узряване и диференциация на 'наивните' лимфоцити до функционално компетентни ефекторни клетки, които елиминират чуждия антиген. Паралелно се формират и клетки на имунната памет, които при повторна среща с антигена осигуряват по-бърз и по-ефикасен отговор. Всяко отклонение в хода на имунния отговор се проявява като патология с широк спектър - от автоимунни и алергични прояви, през рецидивиращи инфекции с обичайни патогени, до тежък вторичен имунен дефицит, придружен от малигнени пролиферации и прогресиращи опортюнистични инфекции.

Настоящата дисертация е целенасочена и подробна дисекция на клетъчния имунен отговор, който осигурява фино равновесие между паметовите и ефекторните субпопулации на Т лимфоцитите, както и механизмите на самоограничаване на имунния отговор след отстраняване на антигена, последвано от затихване на активацията и масова апоптоза на разрасналия се клон.

Обект на дисертационния труд е подробното фенотипно характеризиране на участващите субпопулации на Т клетките, тяхното функционално характеризиране, както и регулаторните механизми, чрез което се поддържа тази

сложна имунна хомеостаза при здрави и при болни с различни хронични инфекции. В работата освен класическите и най-актуални клетъчни маркери са проучени и нови Т лимфоцитни маркери, идентифицирани и характеризирани от научни колективи с водещо участие на авторката. Важна част и заслуга на работата е, че установените в нея сложни теоретични постулати на Т клетъчния имунен отговор, се пречупват и осмислят от диагностична гледна точка, което позволява на авторката да формулира както нови научни хипотези така и диагностични алгоритми за разграничаване на протективния от неефикасния имунен отговор и прогнозиране на клиничното развитие при заболяването. Много полезно за диагностичната имунологична практика е идентифицирането и научното обосноваване на имунните клетъчни параметри, характеризиращи понятието "протективен" имунен отговор и дисбалансите му при хронични инфекциозни заболявания. Разработките в тази плоскост са много перспективни и при други имуномедиирани болести и настоящата дисертация предоставя предпоставки и методология за нови научни проучвания.

Смятам, че дисертационната работа е изключително интересна, много добре планирана и прецизно изпълнена, с изявени теоретични и практически приноси.

Структура на дисертационния труд

Дисертацията е написана е на 277 страници и съдържа 15 таблици и 75 фигури, както и 4 приложения. Работата е много добре онагледена. Библиографията съдържа 480 заглавия. Структурирана е като 3 основни раздела: 1) Характеризиране на нови клетъчни рецептори (SC5 и CD160) и участието им в регулацията на Т клетъчния отговор, 2) Диференциация и баланс на Т лимфоцитните субпопулации в хода на хронични инфекции и 3) Регулаторни Т клетки и антиген-специфичен Т лимфоцитен отговор.

Трудът започва и завършва с информативни и целенасочени и в същото време обобщаващи трите раздела **Въведение и Обобщение и изводи**. Всеки от разделите има въвеждащ литературен обзор, обосноваващ целите и задачите на изследването, собствените данни и коментара им в контекста на световните постижения.

Всички раздели са насочени около темата на дисертацията - механизми за регулация на Т-клетъчния имунен отговор и клиничното им значение,

информативни са и съдържат огромен обем информация, която е обобщена и критично използвана от дисертантката. Като израз на задълбочено познание и опит приемам разсъжденията на авторката, които залягат и в конструкцията на задачите и постановката на изследванията, както и високата и ерудиция при обсъждането на собствените резултати. Цялата дисертация е написана на научно издържан български език, въпреки доста специализираната област. Използваните в работата **материали и методи** са представени много добре в Приложение 4, което аз намирам за много удачно, тъй като дава възможност за съсредоточаване на читателя върху изследванията и обсъждания проблем в съответния раздел и в същото време за лесна справка относно методологията. Използвани са най- съвременни и информативни методи. Данните от всички изследвания са статистически обработени с адекватни методи и получените резултати и изводи са обективни.

При изложението на огромния обем **резултати от собствени изследвания** отново ясно проличава високата ерудиция на дисертантката, както и на научната ѝ среда - Имунологичната лаборатория в НЦЗПБ, ръководена от проф Хр. Тасков и двете френски лаборатории, където д-р Николова неколкратно е работила и извършила значителна част от работата си. От публикациите и дисертационната работа ясно личи извършената огромна експериментална работа лично от дисертантката и умението и ефективно да работи в и ръководи научни проекти и колективи.

Главата „**Обобщения и изводи**” следва логиката на планираните цели, извършените експерименти и значението на получените данни. Това е дало възможност спокойно и последователно да се обобщи още веднъж работата, резултатите и смисъла на намерените резултати в контекста на темата на дисертацията. Накрая е направено обобщение на дисертационния труд, където изпъкват приносите му. Обсъждането е написано интелигентно и с разбиране, което всъщност се отнася и за цялата дисертация.

Изводите от конкретните изследвани проблеми са формулирани главно в трите раздела на работата, а съществените по преценка на авторката приноси са формулирани в Декларация за оригиналност на дисертантката и с които аз съм напълно съгласна.

В дисертацията са открити значими **теоретични научни приноси**, които бих обобщила:

1. Чрез новополучено моноклонално антитяло SC5 е идентифициран непознат епитоп на виментиновия цитоскелет, който се експресира върху активирани Т лимфоцити и тимоцити.
2. Подробно е характеризирана експресията и функцията на молекулата BУ55, която заедно с епитоп, идентифициран с мка TM60 са клъстерифицирани като CD160.
3. Формулирани са основни закономерности на протективния имунен отговор и нарушенията му в условия на хронично антигенно дразнене:
 - в зависимост от антигенното натоварване и независимо от специфичността на антигена се развива характерен фенотипен и функционален дисбаланс на субпопулационно ниво
 - CD4 популацията е по-устойчива на антигенно дразнене и с по-добър регенеративен потенциал. При инфекции с висок вирусен товар преобладават ефектор-паметови CD4 лимфоцити и се увеличават необратимо диференцираните ефектори с Th2 профил.
 - Антигенното дразнене води до по-отчетливи и трудно обратими промени в CD8 популацията: увеличаване на ефектор-паметовите и намаляване на централно-паметовите субпопулации, натрупване на крайно диференцирани апоптотични клонове и стесняване на репертоара от възможни за реакция специфичности. Нарушена е продукцията на функционални молекули (IFN γ , GzB, Per).
4. Формулиран е принцип за дискретното въздействие на регулаторните клетки върху ефекторните и паметови CD8 Т субпопулации, и е описан механизъм за избирателно инхибиране на апоптозата на паметови CD8 Т лимфоцити от Treg посредством регулиране на взаимодействието на PD1/PD-L1.
5. Установено е, че Treg инхибицията зависи от характеристики на антигена. Персистиращото антигенно дразнене води до отпадане на ефекта на Treg върху сигналния път PD1/PD-L1 и нарастване на значението на пътя CD39/ATP.
6. Демонстрирана е патогенетична роля на субпопулацията Treg/CD39+ в условията на хронична HIV инфекция. Установена е корелация между генетичен полиморфизъм (ниска експресия на CD39) и бавна клинична еволюция на инфекцията.

Формулирани са и 10 **научно-приложни приноса**, които бих обобщила така:

1. Рецепторите SC5, p140(CD158k) и ILT1 (CD85j) дефинират циркулиращи клетки от лимфом на Sezary и ги различават от реактивните Т лимфоцити и форми на CTCL.
2. Рецепторите SC5 и ILT1 са функционални и могат да бъдат таргети на имунобазирана терапия. SC5 потискат ин витро пролиферацията на туморни клетки.
3. Количествената експресия на CD38 върху CD4 и CD8 Т лимфоцити е ранен и обективен показател за имунно възпаление.
4. Едновременното използване на маркерите CD45A/ CD27/ CD28/ CD57 предоставя възможност за по-прецизно характеризиране на инфекции с различна тежест и продължителност:
 - Разграничава интензивна имунна активация от продължително нискостепенно антигенно натоварване тип "стареене"
 - Разграничава протективен от неефективен имунен отговор
5. Експресията на CD160 при CD8+ Т лимфоцити е благоприятен прогностичен фактор за ефекта на сART при хронична HIV инфекция.
6. След анализ на 31 фенотипни и функционални параметри е предложен диагностичен алгоритъм за оценка на пациенти с имунно възпаление.
7. Изработени са референтни граници на използваните параметри в диагностичния алгоритъм параметри при здрави лица в българска популация, което създава възможност за директното им приложение в лабораторната практика.
8. Въз основа на характерни фенотипни констелации, главно базирани в CD8 субпопулацията, се създават възможности за лабораторно диагностициране на EBV- свързан хепатит и разграничаване на активна от латентна туберкулозна инфекция.
9. Въведени са в българската диагностична практика методи за флоуцитометрична оценка на антиген-специфичен Т клетъчен отговор при HIV, EBV, CMV, HBV и MTB.

Представеният проект за автореферат отразява адекватно съдържанието и резултатите на дисертационния труд. Във връзка с дисертацията са публикувани 33 статии в авторитетни списания на английски език – чуждестранни (Blood, J.Pathol., Br.J.Dermatol, PLoS Pathog. и др.) с много

впечатляващия Импакт фактор 62.943. и в български списания (Проблеми на инфекциозните и паразитни болести, Clin. Appl. of Immunology, Проблеми на денталната медицина и др.), Тази значителна и качествена научна продукция показва висока стойност и признание на постиженията на доц. Николова. Научните резултати на дисертантката са популярни в света (има 143 цитирания на работите и свързани с дисертацията) и сред българската научна общественост, тъй като са представяни на редица научни форуми. Работата заслужава да бъде предоставена на по-широк кръг читатели и препоръчвам на авторката да публикува материала като монография.

В заключение, дисертационната работа е много добре замислена, структурирана и изпълнена. Тя представлява обобщение на многогодишен плодотворен труд на д-р Николова. Публикационната активност във връзка с дисертационния труд е впечатляваща и е над изискваните за тази научна степен. Представената работа е много добре оформена и онагледена. Тя напълно отговаря на изискванията на закона за развитие на академичните кадри за присъждане на научна степен "Доктор на науките". Затова с голяма увереност и удоволствие препоръчвам на Научното жури да гласува положително за присъждане на научната степен "Доктор на науките" на доц. д-р Мария Християнова Николова.

София,
16. 12. 2012 г.

Рецензент:



Проф. д-р И. Алтънкова, дмн