

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. № 20.... г.
Вх. № 2099/04.09.17 г.
бул. "Янко Сакъзов" № 26
София 1504, тел: 9446999

**НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ
НА НАУЧНОТО ЖУРИ, ОПРЕДЕЛЕНО
СЪС ЗАПОВЕД N233/16.06.2017 Г. НА
ДИРЕКТОРА НА НЦЗПБ**

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Радка Младенова Аргирова, дмн, вирусолог, Болница „Токуда“ - София, сектор „Имуноология и молекуларна диагностика“

ОТНОСНО: Дисертационния труд на Марина Мартинова Александрова, редовен докторант по научна специалност „Имуноология“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 – Биологически науки, научна специалност – 01.06.23 - имуноология

ТЕМА: Проучвания върху ефекторните и регуляторни механизми на клетъчния имунитет при HIV-позитивни пациенти ко-инфектирани с HCV

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Проф. Д-р Мария Николова, д.м.н.

Уважаеми членове на научното жури,

Марина Мартинова Александрова е родена през 1988 г. Завършила е Биологический Факультет на СУ“Св. Кл. Охридски“ - бакалавър по биология 2010 г. и магистър по специалността „клетъчна биология и патология“ през 2012 г. с 6 месечна специализация по програма Еразъм в Гренобъл, Франция в Institut des Neurosciences (INSERM, Unit 836 – team 7 “Nanotechnologies & medicine” & Université Jouseph Fourier). Работила е последователно като лаборант в Института по молекуларна биология „Акад. Румен Цанев“ и биолог в Института по морфология и антропология с музей към БАН – по 1 година. В периода 2013 – 2016 г. е редовен докторант в НЦЗПБ – Отдел по имуноология и алергология, Национална Референтна Лаборатория по имуноология. Владее английски и френски езици.

Предложението ми за рецензиране труд е написан на 161 стр., вкл. 16 стр., съдържащи 294 лит. източника. Трудът е организиран съгласно общоприетите стандарти и съдържа Увод,

Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Заключение, Изводи, Приноси, Публикации по темата на дисертационния труд и участия в научни форуми у нас и в чужбина. Библиография - използвани литературни източници, Приложения – таблици на 10 допълнителни страници, представящи резултати, цитирани и обсъждани в текста. Отделно в началото на труда има подробно съдържание и списък на използваните съкращения.

Дисертационният труд на Марина Александрова е посветен на съвременна и особено актуална тема – ко-инфекцията HIV/HCV – две хронични инфекции, сходни по трансмисия, често и по поведенчески профил, но в случая – сходни и по засягане на клетъчния имунитет, взаимно влияещи се, доскоро често и с фатален край. Въпреки, че след въвеждането на cART (1996 г.), а и в резултат на непрекъснатото обогатяване и подобряване на компонентите на терапията, HIV-инфекцията се превърна в хронична, тя все още е актуална поради настъпваща резистентност, непридържане към засега доживотната терапия, а и поради късно представяне на лицата, живеещи с HIV – често вече със силно увредена имуна система – факти, които често затрудняват и дори компрометират лечението. Инфекцията с HCV стана напълно лечима с новите DAAs – все още с ограничен достъп за голяма част от пациентите. Чест проблем са вече настъпилите у много от тях трайни чернодробни увреждания (фиброза, цироза, декомпенсация, карцином), които трудно се повлияват, въпреки елиминирания HCV.

В литературния обзор са дадени най-съвременни данни – глобално и за България - за темпа на нарастване броя на новооткритите HIV-заразени лица през периода 2010 – 2015 г., както и за динамиката по отношение пътищата на предаване на инфекцията. Ясно е подчертана тенденцията у нас към повишаване броя на новооткритите MSM - 51%, както и все още съществуващата епидемия сред IVDU – 12% от новозаразените лица, респективно в края на 2016 г. На фона на ниската за България HIV-серопревалентност, ко-инфекциите с хепатотропни вируси – HBV, HCV – са широко разпространени при лицата с HIV поради сходните пътища на пренасяне (кръв, сексуални контакти) и към момента – недостатъчно добре проучени. При ко-инфекцията спонтанното елиминиране на HCV става 3-4 пъти по-рядко, а усложненията се развиват по-бързо. Подобни са данните и за ко-инфекциата с HBV. Всичко това е много добре описано от докторантката с използване на най-съвременни литературни данни. Елементите на вродения и придобития клетъчен имунитет са прекрасно разказани, тези страници от лит. обзор звучат като учебник. Много добре са показани „нишите“ в изучаването на ко-инфекциата HIV/HCV, те са свързани с разбирането ни за патогенезата на двойната инфекция, особености на ИО както в условия на естественото й противчане, така и при съвременното лечение. Въпреки, че DAAs безинтерфероновите режими бързо елиминират HCV, не е постигнат консенсус все още по комбинациите на cART с DAAs, последователността/едновременността на прилагане на терапията с оглед минимализиране на възникването на резистентни мутанти и за двета вируса и избягване на допълнително увреждане на черния дроб. Особена „ниша“ съставляват показателите за мониториране на ко-инфекциата. Сега те се свеждат до проследяване на вирусните товари на двете инфекции, но вирусите са единият участник в болестния процес, а как и кои показатели ще се проследяват в другия участник – човека - не е ясно. При тези обстоятелства, както предвид общото за двете инфекции засягане на клетъчния имунитет, става ясна актуалността, важността и новостта на избраната от докторантката и нейния ръководител тема.

Литературният обзор е много богат – с най-съвременни данни и автори, вкл. български. Докторантката демонстрира знания и разбиране на вродения и адаптивния имунитет, участието на богат набор от клетки и молекули /интерлевкини, цитокини, хемокини / във формирането на ефективен имунен отговор, който би трябвало да е в основата на имунологичната цел на съвременната терапия. Тази имунологична цел именно все още остава далечна, за разлика от вирусологичната, макар , че при HIV-инфекциията елиминирането на вируса все още не е осъществено. Но в процеса на това елиминиране и изчистване на вирусните резервоари неминуемо ще се стигне до задълбочаване и на знанията ни за клетъчния имунен отговор.

Особено ми допадна раздел VI от обзора – „Въпроси на бъдещето: рационален имунологичен мониторинг и имунобазирани терапевтични подходи при HIV / HCV ко-инфекция“. Именно в него са най-ясно показани произтичащите от съвременното ни ниво на знания цел и задачи на дисертационния труд. При разглеждане на дисертационния труд на вътрешна защита направих някои забележки към литературния обзор, които са взети под внимание.

Целта и задачите са ясно, пълно и добре формулирани. Още при поставянето им е заложена амбиция за съвременно и реално представяне и анализ на ИО у лицата с HIV/HCV инфекция.

В раздела „Материал и методи“ са описани изчерпателно изследваните пациенти, участващи в ретроспективния и проспективния анализ, контролните групи и критериите за подбора им. За целите на проспективния анализ ясно нагледно са представени използваните набори за разширена имунофенотипизация с флуоресцентно маркирани моно克лонални антитела – mAbs и комбинации за определяне на субпопулации на ефекторни и регулаторни популации на естествения и адаптивния клетъчен ИО. При проспективната кохорта са изследвани 13 показателя на естествения имунитет, 30 показателя на адаптивния имунитет, представящи 26 субпопулации, 7 ключови цитокина плюс индекса IL6/IL2. Използваните много добре дефинирани кохорти от HIV и HIV/HCV за ретроспективен и проспективен анализ са сходни по пол, възраст, относителна продължителност на инфекцията, изчислено по времето от диагнозата до започване на cART, сходство в използваната терапия /по класове cART/. Използваните надеждни панели и най-съвременна техника вдъхват респект и надеждност на получените резултати. Всъщност, овладяването на методите в имунологията е сред основните задачи на дисертанта, с която тя се е справила отлично, без да пропускаме заслугата на научния й ръководител. Към този раздел и неговото представяне нямам забележки.

Резултати и обсъждане – е най-важният раздел в дисертационния труд. Най-напред са определени честотата и епидемиологичните характеристики (главно трансмисивни категории) на хронични ко-инфекции с хепатотропни вируси сред HIV+ лица, регистрирани в отделенията за HIV / СПИН в България – много ценна информация, представена в динамика и даваща сведения не само за мониторинга на HIV- епидемията, но важна и за фармакономиката и бъдещи управлениски решения. В тази част се съпоставят и двете ко-инфекции - HIV/HCV и HIV/HBV. Именно от тези данни се убеждаваме, че хроничните хепатотропни ко-инфекции, и преди всичко HCV/HIV остават актуален проблем - HCV

хронифицира при тези болни на фона на имунен дефицит при липса на активна имунопрофилактика, като не се повлиява пряко от cART, чернодробните усложнения са части в хода на терапията, а и все още липсват задължителни насоки за мониторинг и лечение в условия на коинфекция. Поради тези причини, дисертантката и научният ръководител правилно са фокусирали изследванията си върху групата на HIV/HCV коинфектирани лица. Ретроспективно са проследени основните параметри на стандартния имунологичен и вирусологичен мониторинг на двете кохорт / с моно- и ко-инфекция/ непосредствено преди започване на cART - те показват сходни вирусологични и имунологични параметри. След едногодишна cART обаче ко-инфектиранията кохорта се отличава със значимо по-лош вирусологичен отговор: по-висок среден HIV VL и значително по-голям дял пациенти без вирусологичен успех , което се подкрепя и от забавено имунологично възстановяване. Проспективното проследяване на двете нови кохорт плюс съответни малки контролни групи вече е извършено чрез фенотипен и функционален анализ на ефекторните и регулаторни популации на вродения и адаптивен клетъчен имунитет. При 83% от ко-инфектирите пациенти е потвърдена активна HCV репликация, като този процент е по-висок в сравнение с HCV-моноинфектиранията група /71%, което демонстрира склонността на HCV да хронифицира в условия на HIV ко-инфекция. Ко-инфектиранията група не се отличава съществено по нивата на основните Ly популяции и T-субпопулации от HIV моноинфектиранията преди и в хода на cART. Основните индикатори за активността и прогресията на HIV инфекцията (CD4 AC и HIV VL), както и CD4/CD8 индекса също са сходни преди започване на cART. След едногодишна cART обаче в ко-инфектиранията кохорта /както и при ретроспективното изследване/ се вижда по-слабо възстановяване на CD4 T клетъчната популация, отново придружено с по-висок среден HIV VL и значително по-голям дял пациенти без вирусологичен успех. Много вероятно е HCV да засяга допълнително специфично CD4 T популацията при ко-инфектирите спрямо HIV моноинфектирите лица. Точно тук трябва да се търси и /може би/ нов вид връзка и взаимно повлияване на cART и терапиите с DAAs. Тъй като контролът над вирусната репликация е тясно свързан с функциите на клетъчния имунитет, дисертацията по-нататък третира диференциацията на основните субпопулации на естествения имунитет, диференциацията на ефекторните CD4 и CD8 T клетъчни субпопулации, активацията, функционалната диференциация и изтощаването на ефекторните T Ly и свързаните с тях маркери, диференциацията и функциите на T регулаторната субпопулация (Treg) и накрая, цитокиновия профил, като отражение на баланса между ефекторни и регулаторни механизми на клетъчния имунен отговор

Изследванията са направени много прецизно, представени отлично онагледени, което е важно за разбирането на взаимовръзките в ефекторните механизми на ИО, обединяващи богата съвкупност от клетки и разтворими молекули, като ангажирането на едни или други механизми се определя от особеностите на два силни антигенни стимула. Много интересно би било да се проведе подобен мониторинг при използване на DAAs. Основни достойнства на дисертацията са приносите по отношение на недостатъчно изследваните при коинфектирите пациенти NK и DC субпопулации, субпопулации на CD4 T регулаторните клетки (Treg), както и комплексният цитокинов потенциал /Th1/Th2/IL-17/IL-10/. На базата на тези изследвания се предлагат няколко възможни маркери за мониторинг и прогноза на ко-инфекциите HIV/HCV – определяне на NK Ly, на паметовата CM T лимфоцитна популация като прогностичен маркер на имунологичното

възстановяване при HIV/HCV ко-инфекция, експресията на проапоптичния рецептор PD-1 върху CD4 и CD8 T Ly, CD39+Treg. Направено е заключение в полза на едновременно приложение на анти-HIV и анти-HCV терапията. В светлината на факта, че манипулирането на Treg е от интерес за имунобазиран подход за възстановяване на КИО, за пръв път е изследван *in vitro* ефектът от деплетиране на Treg върху разпределението на цитокин-секретиращи CD4 и CD8 клонове именно при HCV/HIV коинфекция. Отстраняването на Treg при ко-инфекция има благоприятен ефект, тъй като води до превалиране на IL-2 и IL-10+ клонове за сметка на провъзпалителния IL-17 – промени, които могат да ограничат чернодробната фиброза и да помогнат за възстановяване на имунния отговор. Направените изводи и предложения от дисертантката биха могли да доведат до постигане на количествен и качествен ефективен ИО и по-бързо имунно възстановяване.

Като цяло, оценявам много високо дисертационния труд, чийто обем обхваща направо цялата съвременна клетъчна имунология, като подчертавам знанията на докторантката и видимо отличното взаимодействие с много опитния научен ръководител. Езикът е ясен, разбирам, онагледяването - отлично. В текста са приложени 12 таблици, 31 фигури с едно приложение от 10 страници с 5 таблици, отразяващи основни параметри на КИО заедно с прецизна статистическа обработка.

Критични бележки. Тъй като *in vitro* ефектът от деплетиране на Treg върху разпределението на цитокин-секретиращи CD4 и CD8 клонове при ко-инфекциите се изследва за първи път, мисля, че този факт трябва да бъде отразен в изводите. Още повече, че се дава теоретично обяснение /дори хипотеза, спомената по-горе/ и се предлага практическо приложение на деплетирането на Treg. Одобрявам останалите изводи и приносите, описани от докторантката. Литературните източници не са представени по азбучен ред, а в текста авторът цитира по номера, без споменаване имената на авторите. С малки изключения / *in vitro* ефектът от деплетиране на Treg върху разпределението на цитокин-секретиращи CD4 и CD8 клонове при HCV/HIV коинфекция/, практически всички резултати са публикувани в 6 журнални статии /5 - на англ. език е 1 – на български/, 3 от статиите са с импакт фактор, регистрирани са участия в 14 научни форума у нас и в чужбина, както и участие в научен проект по темата, финансиран от МУ - София. В 4 от трудовете докторантката е първи автор, което говори за личното и участие в експерименталната работа и в писменото оформяне на публикациите. Авторефератът представя основните изследвания, изводи и приноси в дисертационния труд.

Актуалната тема, прецизното изпълнение на поставените цел и задачи, научният език и отличното онагледяване на богатите резултати, публикационната активност и участието в престижни научни прояви ми дават основание да препоръчам на уважаемото Научно жури да оцени възможно най-високо дисертационния труд на Марина Александрова „Проучвания върху ефекторните и регулаторни механизми на клетъчния имунитет при HIV-позитивни пациенти ко-инфекциирани с HCV“. Този дисертационен труд отваря врати за богати и още по-задълбочени бъдещи изследвания върху двойната инфекция, особено сега във времето, когато ерадикацията на HCV практически е осъществена, а тази на HIV предстои.

В заключение, дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на НЦЗПБ. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на НЦЗПБ, приети във връзка с Правилника за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Марина Мартинова Александрова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност 01.06.23 имунология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен 'доктор' на Марина Мартинова Александрова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, специалност 01.06.23 - имунология.

София, 02.09.2017 г



Рецензент:
(Проф.дмн Радка Аргирова)