



До Председателя на Научното жури,
определено със заповед № 233/16.06.2017 г.
на Директора на НЦЗПБ – гр. София

СТАНОВИЩЕ

Относно дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование : 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Имунология“

Тема на дисертацията: „Проучвания върху ефекторните и регуляторни механизми на клетъчния имунитет при HIV- позитивни пациенти, коинфицирани с HCV“

Автор на дисертацията: Марина Мартинова Александрова – редовен докторант в отдел „Имунология“ на НЦЗПБ

Автор на становището: Доц. Д-р Ивайло Иванов Еленков, дм, началник Клиника по Вирусни хепатити, чревни инфекции и придобита имунна недостатъчност на СБАЛИП „Проф. И.Киров“ ЕАД, София, външен член за НЦЗПБ-София, определен за член на научното жури със заповед № 233/16.06.2017 г. на Директора на НЦЗПБ-София

Структура на дисертационния труд.

Дисертацията съдържа 161 страници, подредени структурно съгласно изискванията, както следва: съдържание, използвани съкращения, увод – 3 страници, литературен обзор – 43 страници, цел и задачи, дизайн на проучването, материали и методи – 24 страници, резултати и обсъждане – 49 страници, заключение и изводи – 5 страници. Онагледена е с 11 таблици, 31 фигури и едно приложение от 10 страници, съдържащо 5 таблици. Библиографската справка съдържа 294 заглавия, но не подредена според установения стандарт – първо заглавията на кирилица и след това тези на латиница, както и по азбучен ред.

Литературна осведоменост и оценка на обзорния материал.

Литературният обзор е структуриран в шест раздела, както следва:

1. HIV- епидемията през 21 век: тенденции в света и Европа.

2. Регистриране, проследяване и лечение на HIV+ лица в България.
3. Ко-инфекции с хепатотропни вируси при HIV- инфицирани пациенти.
4. Имунен отговор срещу вирусни инфекции.
5. Механизми за нарушаване на протективния имунен отговор в условията на хронична инфекция.
6. Въпроси на бъдещето – рационален имунологичен мониторинг и имунобазирани терапевтични подходи при HIV/HCV ко-инфекция.

Литературните източници, използвани в обзора обхващат над двадесетгодишен период, като две трети от тях са публикувани през последните 5 години.

Впечатляващи са задълбочените познания на дисертантката върху епидемиологията на HIV-инфекцията в страната ни, структурирането и развитието на диагностиката, лечението и проследяването на общата популация HIV+ пациенти, както и със спецификата на тези фактори при специалните категории сред тях, особено ко-инфекцираните с хепатотропни вируси. Отличният образователен ценз и професионална подготовка и на дисертантката изпъкват при представянето на механизмите на имунния отговор в общобиологичен и в патофизиологичен аспект при вирусните инфекции, както в острата така и в хроничната им фаза. Особено ценно в тази насока е познаването на съвременните аспекти на регуляторните механизми на Т-клетъчния ИО и опита да се разкрият причините за неговата неефективност при взаимно потенциращото се взаимодействие между HIV- HCV- инфекциите. Отлично впечатление оставя и познаването на алтернативни сурогатни маркери за рационализиране на мониторирането и изготвянето на имунобазирани терапевтични схеми.

Така написаният литературен обзор е изключително информативен и актуален. Благодарение на това авторката мотивирано формулира целта и задачите, които определят обема и посоката на изследванията, свързани с дисертационната теза.

Целта „Оценка на влиянието на коинфекцията с HCV върху клетъчно-медирирания имунитет при HIV+ пациенти, преди и по време на cART, както и изясняване на някои от механизмите, нарушащи неговата регулация“, е добре формулирана, обоснована и уместна.

Изведените във връзка с това **задачи** са представени в логична последователност, отразяват съвременни технологични методи и диагностични възможности и съдържат нови изследователски елементи.

Te са подредени както следва:

1. Да се определят честотата и епидемиологичните характеристики на хроничните ко-инфекции с хепатотропни вируси сред HIV+ лица, регистрирани в отделенията за HIV/СПИН в Република България.

2. Да се извърши ретроспективен анализ на влиянието на хроничната ко-инфекция с HCV върху имунния дефицит и ефекта от едногодишна сART при HIV+ лица.

3. Да се извърши проспективна оценка на ефекта от HCV ко-инфекцията, в хода на едногодишна сART, върху:

- Диференциацията на основни субпопулации на естествения имунитет;
- Диференциацията на ефекторните CD4 и CD8 Т клетъчни субпопулации;
- Диференциацията на регулаторната субпопулация CD4 FoxP3+ (Treg);
- Стимулирания цитокинов профил, като отражение на баланса между ефекторни и регулаторни механизми на клетъчния ИО.

4. Да се определи функционалният потенциал на Treg и ефекта от тяхното деплетиране в условия на HIV/HCV ко-инфекция, в сравнение с HIV моноЭИФЕКЦИЯ.

5. Да се идентифицират биомаркери, подходящи за функционална оценка на клетъчния имунитет в условия на HIV/HCV ко-инфекция.

Дизайнът на проучването, включващ стратификация на кохортите пациенти, етапите на проследяването и обема на изследваните биомаркери, е представен в оригинална схема-алгоритъм, която носи приносен характер.

Според известните литературни данни клиничното протичане на HCV/HIV-коинфекциията се определя от HIV-свързаната имуносупресия. Именно нейната прогресия ускорява протичането на HCV-инфекцията. Докато влиянието на HCV – върху HIV – не е сигнификантно. Ето защо, поставената дисертационна теза и свързаните с нея задачи са амбициозни, високо отговорни и същевременно носят изследователски предизвикателства.

В разделът „**материали и методи**“ е включена внушителна клинична извадка от 934 HIV+ лица, регистрирани, проследявани и лекувани в клиничните звена за лечение на имунокомпрометирани пациенти от Университетските клиники по инфекциозни болести на София, Пловдив, Варна, Плевен и Стара Загора, на които е направен подробен демографски анализ. Те са разделени на подгрупи в зависимост от потвърдените етиотропни биомаркери както следва: моноЭИФЕКТИРАНИ с HIV, ко-инфектирани с HCV/HIV, ко-инфектирани с HBV/HIV и ко-инфектирани HCV/HBV/HIV. Влиянието на HCV върху имунния дефицит и ефекта на HAART е оценено чрез ретроспективен анализ на параметрите на двете строго диференцирани кохорти – HCV/HIV ко-инфектирани с активна вирусна репликация, съответно за двете инфекции – 52 пациенти и моноЭИФЕКТИРАНИ HIV- пациенти, на лечение за HIV в продължение на 12

месеца, също 52 пациенти. Ефектът от едногодишна сART е оценен по постигнето на траен вирусологичен успех (SVR, дефиниран като двукратно измерен HIV VL под нивото на детекция – $< 1.6 \log_{10}$ HIVРНК копия/мл), абсолютния брой на CD4 Т клетки в периферна кръв, CD4 AC (кл./ μ l) и промяна на CD4 AC (δ CD4 AC) спрямо изходните стойности преди започване на сART.

Влиянието на HCV върху основните параметри на клетъчния имунитет на фона на провеждана терапия в продължение на една година се проследява проспективно(преди , на 1^{ви}, 6^{ти} и 12^{ти} месец от сART) при **25** HIV / HCV сART наивни ко-инфектирани пълнолетни лица в сравнение с **25**, сходни по възраст и изходни параметри HIV-моноинфицирани, всички с поне едно предхождащо изследване в ОПИН на СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“. Проследени са и две контролни групи, съответно HCV-моноинфицирани(14 души) и здрави доброволци(15 души). Така броят на извършените изследвания в хода на проследяването надхвърла значително статистическия минимум и достоверността на изводите не подлежи на съмнение.

Статистическият анализ е извършен чрез специализирана софтуерна програма(GraphPad 4.0 – 6.0).

Методологията на проучването за отчитане и анализ на резултатите включва :

1. Имунофенотипизация.
2. Стимулация на цяла кръв с РНА.
3. Определяне на стимулиран цитокинов профил.
4. In vitro определяне % дял на активирани, цитокинсекретиращи ефекторни T Ly в присъствие и в отсъствие на Treg.

За извършването на всички процедури е използвана съвременната технологична съоръженост на НРЛ по Имунология на НЦЗПБ. Всички процеси са изпълнени с участието на дисертантката под високо компетентното ръководство на Проф. Мария Николова. Тествани са в динамика широк спектър от имунологични параметри-маркери на естествения и адаптивен имунен отговор в различните условия, определени от целта и задачите на проучването.

Използваните вирусологични методи включват диагностициране на HIV, HCV и HBV – инфекциите и тяхното вирусологично проследяване. Извършени са с любезното съдействие на НРЛ по HIV и хепатитни вируси.

Клиничната оценка за стадия на чернодробното заболяване е извършена чрез неинвазивния метод на „FIB-4 score – калкулатор“, използвайки стойностите на AST, ALT, тромбоцитния брой и възрастта на пациентите. Всички тези обстоятелства са предпоставка за съвременната и актуална научна стойност на получените в проучването резултати.

Разделът „результати и обсъждане“ съдържа последователността на изпълнените задачи и съпоставя тяхната оценка в сравнение с известните от литературата данни. Те са систематизирани в три главни части, както следва:

- **Определяне на честотата и епидемиологичните характеристики на хронични ко-инфекции с хепатотропни вируси сред HIV+ лица, регистрирани в отделенията за HIV / СПИН в България;**
- **Ретроспективен анализ на влиянието на хроничната ко-инфекция с HCV при HIV+ лица върху имунния дефицит и ефекта от едногодишна cART;**
- **Проспективна оценка на ефекта от HCV ко-инфекциацията върху параметрите на клетъчния ИО в хода на едногодишна cART.**

Илюстрирани са изключително богато с 4 таблици и 14 фигури, което онагледява добре и спомага за възприемането на обемния статистически материал. Като цяло прави впечатление трудоемкостта на този анализ и добросъвестното му отразяване и интерпретиране.

Оригиналност и безспорна практическа стойност носят установените епидемиологични данни за разпространението на HIV/HCV-инфекцията у нас, а именно: неочеквано високият процент на коинфицираните - 25,6% за изследваните 5 години и обособяването им като концентрирана епидемия, свързана с конкретни високо-рискови групи и практики, но и с реална възможност за разпространение в общата популация. Интравенозната употреба на наркотици се откроява като основен рисков фактор за придобиване на HCV ко-инфекция, което прави скрининга и проследяването за ко-инфекция сред тази трансмисионна група HIV+ лица крайно необходим. Същото се отнася и за придобиващата все по-голямо значение група на HIV+ MSM и лицата с мултирисков профил.

В резултат от извършения подобрен анализ на субпопулациите на вродения и адаптивен имунен отговор при HIV/HCV ко-инфицирани лица, в сравнение сmonoинфицирани контролни групи, е установлен специфичният ефект на всяка от инфекциите върху количествените характеристики и функционално състояние на клетъчният имунен отговор. Естествено следствие от различната по специфичност, интензивност и продължителност антигенна стимулация е различният състав и функционалност на ефекторните Т-лимбоцитни клонове в условията на моно- и ко-инфекция.

Особено ценна информативност, касаеща имунопатогенезата при двете взаимно потенциращи се инфекции и опитите за тяхното лечение имат получените резултати относно ефекта на комбинираната имунна стимулация. Тя се проявява като задълбочаване на дисбаланса между ефекторни и регулаторни сигнали. Интересно е, че едностренното приложение на терапия само за една от инфекциите (HIV-инфекцията)

потенцира допълнителни патогенетични механизми с крайно неблагоприятен ефект върху имунното възстановяване. Най-съществените са персистиращата активация на CD4 и CD8 Т лимфоцитите, с директно отражение върху поддържането на латентни HIV вирусни депа, допълнителното индуциране на Treg с повишена експресия на CD39, трайно изчерпване и дисбаланс на цитокиновия потенциал. Изключително ценна практическа насоченост носят резултатите, насочващи към необходимост от използването на разширен панел за имунофенотипизация, включващ периодична оценка на активацията, функционалния потенциал и изтощаването на NK (CD56, CD160) и T Ly субпопулации (CD38, PD1, CD160, CD39 Treg, IFNg, IL-17, IL-2/IL-10). Използването на разширен панел за имунологичен мониторинг, в комбинация с вирусологичен мониторинг на всяка от инфекциите, със сигурност ще повлияе избора и провеждане на ефективно лечение с елиминиране на хепатитната ко-инфекция.

С появата на директно действащите противовирусни медикаменти за лечение HCV-инфекция и влиянието им върху имунопатогенезата при коинфекцията с HIV, приложението на разширения имунологичен панел за проследяване продобива особена актуалност, още по-вече че данните в тази област са осъкъдни, все още.

Изводите, произходящи от систематизирано представените резултати носят определено базисно-научен потенциал. Като най-съществени бих отбелаязъл следните:

- При сравними изходни характеристики, пациентите с HCV/HIV ко-инфекция се отличават от HIV-моноинфицираните със забавено имунологично възстановяване (нарастване на CD4AC и CD4/CD8 индекс) и по-висока честота на вирусологичен неуспех след 12-месечна cART.
- И двете хронични инфекции (HIV, HCV) предизвикват ускорена диференциация на Т-лимфоцитния пул и нарушен генериране на имунна памет. Ко-инфекциията води до допълнителна активация на CD4 Т лимфоцитите, вкл. на фона на cART, и изчерпване на активираните цитотоксични (CD160+CD8+) Т лимфоцити.
- Коинфекцията с HCV допълнително потиска секрецията на ефекторни и регулаторни цитокини и възпрепятства тяхното възстановяване на фона на cART. Трайно пониженото съотношение IL-2/Il-6 отразява регулаторния и ефекторен дисбаланс на ИО.
- Ко-инфекциията с HCV допълнително изтощава ефекторните механизми на клетъчния ИО и индуцира Treg, независимо от cART. Съвременното прилагане на DAAs при тези пациенти е задължително условие за имунологичното им възстановяване

- Цитокиновият профил при хронична инфекция зависи както от инхибиращия потенциал на Treg, така и от специфичното състояние на Т-ефекторните клонове. Отстраняването на Treg в условия на HIV/HCV коинфекция им води до благоприятни промени в цитокиновия баланс (IL-10/IL-2/IL-17).

Оригиналните научни приноси на този труд, коректно отразени от автора с които съм напълно съгласен, са :

1. За първи път у нас се прави подробен анализ на честотата и епидемиологичните характеристики на ко-инфекциията с HCV сред HIV+ популация в България за петгодишен период.
2. Демонстриран е независимият отрицателен ефект на ко-инфекциията с HCV върху имунологичния и вирусологичен ефект от едногодишна непрекъсната cART.
3. Направена е подробна характеристика на ефекторните и регулаторни клетъчни популации на естествения и адаптивен ИО при ко-инфекција с HCV/HIV и е оценено влиянието на всяка от monoинфекциите върху наблюдаваните патологични отклонения.
4. Направена е комплексна оценка на цитокиновия потенциал в условия на нелекувана HIV/HCV ко-инфекция и на фона на cART.
5. Направена е директна *in vitro* оценка на инхибиращия потенциал на регулаторните Т клетки върху Т клетъчния отговор в условия на нелекувана HIV/HCV ко-инфекция.

С приложен характер са приносите, свързани с определяне на параметрите за проследяване на функционалното имунологично възстановяване при HCV/HIV ко-инфектирани пациенти, лекувани с антиретровирусна терапия и определянето на референтни стойности за субпопулациите на регулаторните Т клетки (nTreg, eTreg, mTreg) и стимулираните нива на цитокин IL-17. Категорично подкрепям твърдението, че описаните *in vitro* ефекти от деплетиране на Treg в условия на HIV и HIV/HCV ко-инфекција могат да послужат при разработването на имунобазирани подходи за възстановяване на Т клетъчния отговор.

Науко-метрични показатели. Във връзка с изработването на дисертационния труд авторката е представила 6 оригинални статии, публикувани в наши и чуждестранни научни издания, две от които с импакт фактор. Приложен е и списък на 14 участия в наши и международни научни форуми. Има спечелен „ГРАНТ-2016“ на МУ София за финансиране разработката на дисертационната тема.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Дисертацията на Марина Александрова е пионерска за страната ни, носи научни и практически послания в една неразработена и малко позната в науката област – имунотерапията и радикалното лечение на HIV/HCV ко-инфекцијата. Тя е изключително актуална, блестящо

изпълнена и подходящо оформена. Съгласен съм с изложените научни приноси с научен и приложен характер. Рецензираният труд отговаря на изискванията и критериите за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Представеният автореферат отразява правилно основните постижения на дисертацията.

Предвид гореизложеното предлагам на уважаемите членове на научното жури да оценят положително дисертационния труд на Марина Мартинова Александрова и да и присъдят образователната и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование : 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Имунология“.

29.08.2017 г.

София.

Доц. Д-р Ивайло Еленков, д.м.

