

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. № 29..... г.
Вх. № 94-54/14 08 2024 г.
Бул. "Янко Сакъзов" № 26
София 1504, тел: 9446999

До Председателя на Научното жури
проф. д-р Искра Райнова, дмн
назначено със Заповед № 189/14.06.2024 г.
на Директора на НЦЗПБ-София

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дм, мзм,
Катедра Микробиология и Имунология „чл. кор.проф. Елисей Янев“
при Медицински Университет –Пловдив

относно дисертационен труд за ОНС „доктор“
на тема: „Постекспозиционен и постваксинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-CoV-2“
автор: д-р Милена Звонко Алексова
докторантура: редовна, в НЦЗПБ-София , отдел „Имунология“
област на ВО: 7.Здравеопазване и спорт
професионално направление 7.1. Медицина
научна специалност: Имунпатология и алергология
Научен ръководител: проф. д-р Мария Николова, дмн, НЦЗПБ-София

Д-р Алексова е завършила висше образование - магистър по медицина, през 2018 г. в университет "Св. Кирил и Методий, гр. Скопие, Северна Македония. После работи като общопрактикуващ лекар в същия град за периода 2019-2020 г. От 2021 г. е редовен докторант в НЦЗПБ-София, отдел „Имунология“ под ръководството на проф. д-р Мария Николова. Представените биографични данни показват, че за краткото време на професионалния си път дотук, д-р Алексова е отбелязала възходящо и убедително кариерно развитие на млад учен, като е разработила докторска програма, има общо 6 публикации, две от които с IF, и е участвала като изследовател в 7 научни проекта с национално финансиране. Основните ѝ научни интереси са в областта на инфекциозната имунология, имунологичната памет, имунофенотипизация и флоуцитометричен анализ на лимфоцитни популации.

Актуалността на разработения от д-р Алексова дисертационен труд се обуславя от няколко тенденции:

1. COVID-19 е инфекция със социална значимост, със значим пандемичен потенциал и обезпокоително ниво на леталитет. Причинителят ѝ – вирусът SARS-CoV-2, заема сериозно място в инфекциозната патология поради честите мутации, възможността да атакува много системи в организма и непродължителния имунен отговор, който затруднява специфичната профилактика
2. Заболяването е свързано със значителни разходи за диагностика и лечение. В допълнение на това липсват систематизирани данни за значението на имунния отговор, и по-специално на Т-клетъчната памет като кинетика и характеристики срещу

причинителя, които биха могли да осветлят имунопатогенезата на заболяването и продължителността на поствакциналният имунитет.

Всичко това обуславя и интереса на докторантката към избраната тема. Прилагането на точни и надеждни имунологични тестове за изясняване на Т-клетъчната имунна памет след преболедуване и ваксинация срещу SARS-CoV-2 е несъмнена необходимост за страната ни и в този смисъл разработеният дисертационен труд е актуален и навременен.

Дисертационният труд е написан е на 187 страници и е структуриран в следните раздели: увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, литература, публикации, участия в научни форуми. Съотношението между отделните раздели е приемливо. С удоволствие подчертавам доброто онагледяване на текста с информативни фигури (58 бр.) и таблици (6 бр.). Научният труд е написан на точен медицински език. Изложението се чете лесно, а данните се възприемат ясно.

Литературният обзор умело очертава историческите данни за възникване на вируса SARS-CoV-2, епидемиите от SARS и MERS, характеристиките на вирусните варианти и техните промени, патогенезата на COVID-19, имунният отговор (постекспозиционен и след ваксинация) с участието на имунна памет и стволови паметни клетки, видовете ваксини срещу вируса. Прецизно са описани известните методи за доказване на Т клетъчния имунен отговор – IGRA тестове (ELISA и EliSpot) и флоуцитометричен анализ на специфично-активирани Т клетки. Добро впечатление прави финалът на обзора с подчертаване на неизяснените въпроси на имунната памет при боледуване и след ваксинация.

Литературната справка е впечатляваща - съдържа 469 източника. Изборът им подкрепя впечатлението за добрата осведоменост на авторката и възможностите ѝ да анализира адекватно известните до момента данни по проблема.

На базата на аналитичния литературен преглед докторантката извежда ясно поставена цел – *“да се изследват възникването, персистирането и функционалните характеристики на SARS-CoV-2-специфичните Т клетки, индуцирани след инфекция, имунизация или хибридна експозиция”*, за чието изпълнение си поставя 7 ясно оформени задачи.

Разделът **“Материали и методи”** прави впечатление с изследваните 243 пациенти с доказана SARS-CoV-2 инфекция в остра фаза на COVID-19 (по време на хоспитализацията и/или < 20 дни след PCR (+) резултат), до 3 месеца след PCR (+) резултат – 105, от 3 до 9 месеца след PCR (+) резултат – 119, от 9 до 12 месеца след PCR (+) резултат – 26, над 12 месеца след PCR (+) резултат – 69. Проследени в динамика са 124 пациента – двукратно, 41 - трикратно и 12 - четирикратно (средно, съответно, 93, 254 и 378 дни след PCR+ резултат). Контролните групи включват лица без данни за прекарана инфекция, ваксинирани срещу SARS-CoV-2 (120) и клинично здрави лица без данни за прекарана инфекция, не ваксинирани – 38. Съхранени са изолирани лимфоцити от 279 донора и серум/плазма от 449 донора. Внимателно подбрани са високо-информативни имунологични методи за постигане на зададените резултати - директна имуофлуоресценция за доказване на човешки левкоцитни антигени с флоуцитометрия и подробно описание на панелите от използваните моноклонални антитела, стандартите и активаторите на Т клетките; Т спот за определяне на Т-клетъчния отговор срещу SARS-CoV-2 (T-SPOT.COVID); ELISA за определяне на IgG срещу сезонните (човешките) коронавируси, както и за определяне на RBD-свързващи SARS-CoV-2-специфични IgG и IgA; определяне на цитокинов и хемокинов профил с Lumindex.

Изборът на тези методи е предпоставка за логични и последователни резултати. Добросъвестното и подробно описание на използваните методи насочва и към доброто усвояване на техниките при разработване на дисертацията.

Резултатите включват 5 части със собствените проучвания на д-р Алексова. Безспорно достойнство на труда са идентифицирането на фенотипните профили, свързани с клиничната тежест на COVID-19 и определянето на цитокиновия и хемокиновия профил при пациентите с инфекция. През призмата на модерните използвани диагностични и изследователски методи е проучена динамиката на специфичния за SARS-CoV-2 Т клетъчен имунен отговор. Високо оценявам резултатите върху изследването на SARS-CoV-2 специфичните CD8⁺ CD4⁺ Т лимфоцити в динамика, диференциация и реактивност, както и сравнителния анализ между естествено-индуцирания и потваксинален имунитет срещу SARS-CoV-2.

Изводите са правилно и синтезирано формулирани, кореспондират на поставените задачи и получените резултати. Те са 9 броя, като обобщават основните резултати.

Авторефератът представя основните резултати от дисертационния труд в синтезиран вариант.

Критичните ми бележки са предимно технически:

1. Към оформеното „Съдържание“ в началото на дисертацията – номерацията в римски цифри на раздела „Материали и методи“ е объркваща, тъй като има повторения на цифрите. Биха могли да се заменят с главни букви, вместо да се повтарят римските цифри. Страниците, отбелязани в началото на раздела „Съдържание“ не отговарят на фактическата им подредба в основното тяло на дисертационния труд.
2. Пак към „Съдържание“ в началото на дисертацията – обясненията към т.11, 12 и 13 (за BFA, пермеабилзиращ разтвор и ЕДТА) от подраздел „Разтвори, буфери и хранителни среди“, както и към т.7 за подраздел „Китове и консумативи“ не е необходимо да бъдат описвани тук, а в самия текст
3. Препоръчително е изписването на фенотипа на лимфоцитите да е със знаците „+“ или „-“ в „superscript, напр. CD4⁺, CD8⁺, CD3⁻ и т.н.

Приемам формулираните **научни приноси** на дисертационния труд, обобщени в 2 групи:

1. **Научно-теоретични оригинални** - извършено е първото проспективно проучване на Т-клетъчната имунна памет към SARS-CoV-2 в страната; доказано е за пръв път, че ранното нарастване на индуцираните Т-регулаторни клетки (Treg/CD39⁺) е свързано с по-тежкия ход на SARS-CoV-2 инфекцията; описана е като патогенетичен механизъм нерегулираната секреция на цитокини с инхибиращ ефект, която компрометира ефекторната функция на Т-лимфоцитите, без да успее да контролира имунното възпаление при лица с тежък COVID-19; формулирана е хипотеза за кръстосан протективен ефект на инфекции със сезонния HCoV HKU-1, в резултат на стимулиране на паметови CD8 Т клетки, разпознаващи структурно сходни пептидни епитопи от SARS-CoV-2; доказано е, че SARS-CoV-2-специфичните CD8⁺ стволови паметови клетки (TSCM) са достъпен и относително независим от вирусната еволюция индикатор за дългосрочна защита от COVID-19; установено е, че кръстосаната реактивност на вирус-специфичните паметови Т лимфоцити с еволюирали варианти на SARS-CoV-2

(ХВВ, ВА) зависи значимо от тежестта на инфекцията, последващата имунизация и наличието на RBD-специфични IgA.

2. **Научно-приложни** - въведена е модификация на IFN- γ базирания ELISpot тест, позволяваща да се открият SARS-CoV-2 специфични Т-лимфоцити повече от 12 месеца след експозицията; сравнена е приложимостта на различни подходи за оценка на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен имунен отговор и е доказано, че IFN- γ базираните тестове зависят от времето след експозиция и са информативни в условия на активна циркулация на вируса, както и че идентифицирането на SARS-CoV-2-специфични Т лимфоцити по експресията на активационни молекули (AIM+T) е по-изчерпателно и не зависи от епидемичната обстановка; показано е, че съчетаното използване на съотношенията IFN γ /IL-10 и IL-6/IL-10 е подходящо за мониториране клиничния ход на COVID-19; въведен е флоуцитометричен метод за детекция и функционално характеризиране на вирус-специфични стволови паметови Т-клетки.

Резултатите от проучванията в дисертацията са представени в списък от 4 публикации и участия в 17 научни форуми (5 международни и 12 национални). Докторантката е първи автор в 3 от публикуваните статии и втори в една от тях. Една статия е публикувана в Diagnostics с IF 3.6 и квантил Q2. Останалите са в български списания и сборник от научни участия. Прави впечатление водещото участие на д-р Алексова в три от международните форуми. Всички публикации и съобщения са по темата на докторантската програма. Водещото участие на авторката недвусмислено говори за активната ѝ роля в разработвания проблем, а броят на публикациите и представените участия на научни форуми подкрепя впечатлението, че по-голяма част от резултатите на дисертационния ѝ труд са станали достояние на научната общност у нас и в чужбина.

В заключение, считам, че представената дисертация на д-р Милена Алексова е актуален и завършен научен труд, подготвян систематизирано и компетентно под вещото ръководство на проф. Мария Николова, със съществен приложен принос в областта на съвременната имунология на COVID-19 и ваксинопрофилактиката срещу причинителя. Темата е разработена в отговор на нарастващата необходимост за по-задълбочено познание върху имунологичните особености на вируса SARS-CoV-2 и по-конкретно върху Т-клетъчната памет след заболяване и ваксинация, а получените резултати са предпоставка за разработване на дългосрочни стратегии за специфична превенция. Дисертационният труд напълно отговаря на научните критерии в ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ-София за ОНС "доктор". Това ми дава основание да гласувам категорично като член на Научното жури за придобиване на същата степен от д-р Милена Алексова в научна специалност "Имунопатология и алергология"

12.08.2024 год.

Изготвил становището:

Проф. д-р Мариана Мурджева, дм