



РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Христо Борисов Тасков дмн, Научна специалност "Имунопатология и алергология", Медицински университет-Пловдив, Катедра по медицинска микробиология и имунология „проф. Елисей Янев“, член на научно жури съгласно заповед № 198 от 14.06.2024 на Директора на НЦЗПБ

Относно: Процедура за защита на дисертационен труд на тема:

ПОСТЕКСПОЗИЦИОНЕН И ПОСТВАКСИНАЛЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СРЕЩУ SARS-COV-2 за придобиване на образователна и научна степен "Доктор"

Автор на дисертацията: д-р Милена Алексова, редовен докторант при Национален център по заразни и паразитни болести

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление: 7.1 Медицина; Научна специалност: Имунология и алергология

Научен ръководител: проф. д-р Мария Николова, дмн

Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане (ПЗРАСРБ), Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности (ПУРПНСЗАД) в НЦЗПБ.

Представените материали са на електронен носител са в съответствие с процедурата за защита на дисертационен труд за придобиване на научна степен "ДОКТОР" и правилника на НЦЗПБ. При прегледа на предоставения ми за рецензиране дисертационен труд не откривам данни за плагиатство.

Декларирам липсата на общи научни разработки с докторанта и на потенциален конфликт на интереси.

I. Биографични данни

Д-р Милена Алексова се дипломира като магистър по медицина през 2018 година в университет Св. Кирил и Методий, гр. Скопие, Северна Македония. Същата година участва в програма Еразъм+ - Медицински университет, Пловдив. 2018-2019 провежда следдипломен стаж в Университетска клиника „Майка Тереза“, Скопие. От 12.10.2021г. – до сега: редовен докторант в отдел „Имунология“, Национален център по заразни и паразитни болести – програма - Имунопатология и алергология.

II. Провеждане на докторантурата

Със Заповед № 248 /12.10.2021 г. д-р Милена Алексова е зачислен като редовен докторант по докторска програма: „Имунопатология и алергология“ с научен ръководител проф. д-р Мария Николова, дмн. д-р Милена Алексова е взела предвидените по програма четири колоквиуми и кандидатски минимум в две части (Първа част на 1.12.2022 и втора част - 11.07.2023).

Със заповед №187 от 14.06.2024 д-р Милена Алексова е отчислена от докторската програма с право на защита

Във връзка с дисертационния труд д-р Милена Алексова е съавтор на 6 научни публикации и има участия в 32 научни форума. Тя е участвал в седем научни проекта.

III. Актуалност и значимост на темата

Дисертационната разработка е посветена на съвременните аспекти на ролята на Т-клетъчния имунен отговор в защитата срещу инфекция със SARS-CoV-2

SARS-CoV-2, вирусът, причиняващ COVID-19, предизвика глобална здравна криза, подчертавайки необходимостта от разбиране на имунния отговор за разработване на ефективни лечения и ваксини. Т-клетъчната имунен отговор играе решаваща роля в адаптивния имунитет, ограничавайки или предотвратявайки вирусната реинфекция. След инфекция със SARS-CoV-2 или ваксинация, паметта на Т-клетките е широка, обхващаща множество вирусни протеини и епитопи (около 20 при всеки индивид). Отговорът на паметта на Т-клетките е дълготраен и осигурява кръстосана реактивност, като се противопоставя на вирусното бягство от варианти като варианта на омикрон.

Разбирането на Т-клетъчния отговор към SARS-CoV-2, както след експозиция, така и след ваксинация, е от решаващо значение за управлението на пандемията и разработването

на бъдещи ваксини. Въпреки че е постигнат значителен напредък, текущите изследвания са от съществено значение за справяне с оставащите въпроси относно дълголетие на имунитета, въздействието на нововъзникващите варианти и оптималните стратегии за повишаване и поддържане на отговорите на Т-клетките в различни популации. Разбирането на Т-клетъчно-медиацията на имунитета е от решаващо значение за готовността за пандемия и дългосрочната защита

Още в началото на епидемията от SARS-CoV-2 научният ръководител проф. Мария Николова е насочила научните изследвания на д-р Алексова в споменатите по-горе неизвестни характеристики на имунния отговор срещу новия вирус.

II. 1. Структура на дисертационния труд

Научният труд на д-р Милена Алексова отговаря на изискванията за разработване на дисертационни трудове: начин на структуриране, представяне на проблема, анализ на получените данни и защита на основните тези на автора.

Представеният материал е написан на 147 стандартни страници без литературата и съдържа 58 фигури и 5 таблици. Литературната справка наброява 469 заглавия, всички на латиница. Библиографията е актуална и изчерпателна, като източниците са подбрани тематично максимално близо до дисертационния труд.

Обзорът на научната литература е целенасочен и информативен, като предоставя един актуален преглед на съвременните проблеми на възпалението като патологичен процес. Добре са описани молекулярните механизми на възпалението и участващите в него медиатори и рецептори, клиниката, класификацията, клиничните форми, етиологията и медикаментозното лечение.

Представени са подробни актуални данни за характеристики и еволюция на SARS-CoV-2, за сезонните коронавируси и епидемиите от SARS и MERS. Разгледани са вирусни антигени, вирусна еволюция и вирусни варианти с повишено значение за общественото здраве. Във връзка с темата на дисертацията, централно място е отделено на патогенеза на COVID-19 и по-специално на адаптивен имунен отговор срещу вируси/SARS-CoV-2. Подробно са представени актуални данни за Т-клетъчен имунен отговор и Т-клетъчна памет и съвременните методи за тяхното характеризиране.

Те са конкретни, много добре формулиране и очертават ясен план за провеждане на изследванията

Цел и задачи

На базата на направения анализ на нерешените въпроси са формулирани целта и 7 задачи на дисертационния труд. Целта на дисертационния труд е ясна и точна. Задачите са конкретни и са пряко свързани с решаването на научната хипотеза и постигането на целта на проучването.

Материалът и методите са описани много изчерпателно. Методични подходи са правилно подбрани, както за разрешаване на поставената цел, така и с оглед на надеждност и достоверност на докладваните резултати. Броят на контролната група от здрави лица и от трите заболявания е достатъчен за статистически анализ.

В тази част на дисертационния труд се вижда, че докторантът е усвоил голям набор от съвременни методи за анализ на хуморалния и Т-клетъчния имунен отговор като: Детекция на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG и -IgA с ELISA метод; детекция на IgG срещу HCoV-229E, NL63, OC43 и HKU1 с ELISA метод; измерване на цитокини и хемокини с мултиплексен метод; Използване на многопараметърна флоуцитометрия за определяне на Т-клетъчни субпопулации (наивни, ефекторни паметови и стволови клетки, както и за детекция на Т-клетъчни субпопулации, специфични за различни антигени на коронавируси; определяне на количеството на антиген специфичните Т-клетки чрез ELISpot.

Д-р Алексова е подбрала и използвала правилно методични подходи за разрешаване на поставената цел и задачи..

Приложените статистически методи са съвременни и подходящи за анализ на данните от проучването. Нямам забележки или препоръки към този раздел и му давам висока оценка.

Резултатите са представени на 51 стр., като описанието на данните следват логично реда на задачите на дисертационния труд. На базата на изследване на 9 цитокина в серума са представени данни за цитокинов и хемокинов профил при пациенти в остра фаза на инфекция. Динамиката на SARS-CoV-2 специфични RBD-IgA и -IgG е изследвана в продължение на 365 и е съпоставена със специфичния Т-клетъчен имунитет, като несъответствието между клетъчния и хуморален отговор се задълбочава с времето, изминало от инфекцията и то е предимно за сметка на намаляващи титри на специфичните антитела. Важен момент в дисертацията е изследването на кръстосана реактивност чрез

определяне на имунитета към най-често срещаните сезонните коронавируси (NL63, 229E, OC43, HKU1) и податливост към SARS-CoV-2 инфекция. Наличието на значително по-високи нива анти-HKU-1 IgG в групата на интензивно експонирани и не боледуващи донори (B), показва възможен кръстосан защитен ефект на анти-HKU-1 IgG срещу SARS-CoV-2.

Друг важен въпрос за ваксина-профилактиката е сравнение между естествено индуцирания и пост-ваксинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-CoV-2. Тук д-р Алексова привежда убедителни данни за наличието на измерим Т-клетъчен имунитет на 4-тия месец след първата доза ваксина. Специфичен отговор се установява както в CD4 клетъчния пул, така и в CD8 клетъчния пул. Това води логично до изследването на естеството и продължителността на Т-клетъчната имунна памет. Привеждат се убедителни данни, че Т- стволовите паметови клетки се откриват в циркулацията и функционират повече от 18 месеца след заразяването, което е важен аргумент за ефективността на ваксина-профилактиката.

Тези интересни резултати са допълнени с проучване на еволюция на вируса и реактивност на вирус- специфичния Т клетъчен пул, като са използвани пептидни пулове от бета, гама, делта и ламбда вариант на SARS-CoV-2. Резултатите показват, че значителна част от отговорите на Т клетките се запазват, което означава, че еволюцията на SARS-CoV-2 оказва минимално въздействие върху ефективността Т клетъчния имунен отговор срещу вируса.

Като цяло резултатите са много добре описани и са отлично онагледени с фигури и таблици, които дават синтезирана информация и улесняват възприемането на материала. Статистическата достоверност е представена отлично както в текста, така и при фигурите и таблиците. Получените резултати са убедителни и са представени ясно и точно, което създава отлична прегледност и документиране на научните факти.

Нямам забележки или препоръки към този раздел и считам, че д-р Милена Алексова се е справила отлично с обработването и представянето на резултатите от едно такова сложно изследване.

Обсъждане и заключение . Това е един от най-важните, но и най-трудните раздели на един дисертационен труд. Изхождайки от това д-р Милена Алексова е отделила 20 страници за обсъждане на резултатите дисертационния труд. Обсъдени са всички получени резултати с конкретни заключения..

Д-р Алексова много умело съпоставя собствените резултати с тези на други автори. Направения анализ убедително показва ключовата роля регулаторните Т клетки CD4⁺ CD25^{hi}CD127^{neg} и цитокиновия дисбаланс за имунопатологичните промени при тежките форми на COVID-19. Заедно с това убедително е демонстрирана ролята на Т-клетъчната имунна памет за продължителността на естествено придобития и поствакцинален имунитет срещу SARS-CoV-2.

Давам висока оценка на този раздел.

Изводи. Изводите са 9 и са много добре формулирани. Те са конкретни, произтичат от направеното обсъждане и точно отразяват приносите на дисертационния труд.

Критични бележки и препоръки към дисертационния труд.

III.2. Приноси

Д-р Милена Алексова е посочила 10 оригинални научни приноса, от които 6 са с теоретичен характер и 4 с научно-приложен характер.

Към **оригиналните приноси с теоретичен характер** могат да се отнесат следните:

1. За пръв път е направена връзка между по-тежко протичане на SARS-CoV-2 инфекцията и ранното нарастване на индуцираните Т-регулаторни клетки (Treg/CD39⁺).
2. При тежък Ковид 19 е разкрита е ролята на нерегулираната секреция на цитокини с инхибиращ ефект е описана, която компрометира ефекторната функция на Т-лимфоцитите, без да успее да контролира имунното възпаление.
3. Формулирана е хипотеза за кръстосан протективен ефект на инфекции със сезонния HCoV HCU-1, в резултат на стимулиране на паметови CD8⁺ Т клетки, разпознаващи структурно сходни пептидни епитопи от SARS-CoV-2.
4. Демонстрирано е, че SARS-CoV-2-специфичните CD8⁺ стволови паметови клетки (TSCM) са достъпен и относително независим от вирусната еволюция показател за дългосрочна защита от COVID-19.
5. Установено е, че кръстосаната реактивност на вирус-специфичните паметови Т лимфоцити с еволюирали варианти на SARS-CoV-2 (XBB, BA) зависи значимо от тежестта на инфекцията, последващата имунизация и наличието на RBD-специфични

IgA.

Приноси с научно-приложен характер:

1. Въведена е модификация на IFN gamma базирания ELIspot тест, която позволява да се открият SARS-CoV-2 специфични Т-лимфоцити повече от 12 месеца след експозицията.

2. Сравнена е приложимостта на различни подходи за оценка на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен имуен отговор и е:

3. Доказано, че IFN-gamma базираните тестове зависят от времето след експозиция и са информативни в условия на активна циркулация на вируса;

4. Идентифицирането на SARS-CoV-2-специфични Т лимфоцити по експресията на активационни молекули (AIM+T) е по-изчерпателно и не зависи от епидемичната обстановка

5. Демонстрирано е, че съчетаното използване на съотношенията IFNg/IL-10 и IL-6/IL-10 е подходящо за мониториране клиничния ход на COVID-19.

6. Въведен е флоуцитометричен метод за детекция и функционално характеризиране на вирус-специфични стволови паметови Т-клетки.

Определено считам, че научната и практическата стойност на направените приноси е безспорна.

Ш.3. Оценка на задължителните наукометрични показатели, свързани с дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 6 журнални статии. Една от статията е в списание с импакт фактор 3.6 а друга в списание с импакт ранг. В три от публикациите д-р Алексова е първи автор, а в другите ясно се откроява нейният научен принос. Представена е справка за участие в 8 като първи автор и 24 научни форума като съавтор. Считам, че по този начин резултатите на дисертационния труд са получили много добра независима научна оценка и са станали достойние на широк кръг от академичната общност. С това е изпълнено едно от важните изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане

(ПЗРАСРБ).

III.4 Автореферат

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията. Той съдържа най-съществените резултати изводи и приноси.

V. Извод

Познавам лично д-р Милена Алексова и съм свидетел на нейното научно и професионално израстване. От представения дисертационния труд мога да заключа, че тя е навлязла теоретично и методично в дълбочина на проблема Т-клетъчния имунитет и Т0клетъчната имунна памет. От обзора и обсъждането проличава, че тя е запозната с публикуваните научни факти и може правилно да ги съпоставя и интерпретира. В методично отношение тя е овладяла и адекватно приложил голям набор от съвременни методи за изследване на адаптивния Т-клетъчен имунитет и имунната памет. Получените резултати са анализирани с подходящи статистически методи и са описани и онагледени много добре. Д-р Алексова е усвоила отлично научния анализ на резултатите и е способна да прави научни заключения и изводи. Определено считам, че представеният дисертационен труд съдържа достатъчно оригинални научни приноси, които биха имали практическо приложение, както за мониторинга на COVID-19 така и за неговата имунопрофилактика.

Обобщено, дисертационният труд показва, че д-р Милена Алексова притежава необходимите теоретични познания и професионални умения по научната специалност „Имунопатология и алергология“, както и че демонстрира качества и умения за организиране и провеждане на качествено научно проучване. Всичко това ми дава основание да заключа, че дисертационният труд отговаря изцяло на изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Р България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане (ПЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности (ПУРПНСЗАД) в НЦЗЛБ

Във връзка с изложеното по-горе убедено давам своята положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемите членове на уважаемото научно жури да

гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен “Доктор ” на д-р Милена Алексова област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт“, професионално направление „7.1 Медицина“, научна специалност „Имунология и алергология“.



22.07.2024

гр. Пловдив

Подпис:

/ проф. д-р Христо Тасков дмн