

**НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ
НА НАУЧНОТО ЖУРИ /НЖ/, ОПРЕДЕЛЕНО
СЪС ЗАПОВЕД N189/14.06.2024 г., ИЗДАДЕНА
ОТ ДИРЕКТОРА НА НАЦ. ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ, СОФИЯ**

РЕЦЕНЗИЯ

**от проф. д-мн Радка Младенова Аргирова, лекар-вирусолог, Клинична
Лаборатория, УМБАЛ Токуда, София**

Относно защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ в област на висше образование 7: „Здравеопазване и спорт“, по професионално направление: 7.1. „Медицина“, научна специалност „Имунопатология и алергология“.

На Д-р Милена Звонко Алексова на тема: **Постекспозиционен и постваксинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-CoV-2**”.

Научен ръководител: Проф. д-р Мария Николова, д-мн

Уважаеми членове на научното жури,

Настоящият дисертационен труд е разработен в отдел „Имунология и алергология“ към НЦЗПБ, гр. София, представен е и насочен за публична защита на разширен колегиум на отдел „Имунология“ на 10.06.2024 година. Дисертационният труд е написан на 187 страници, онагледен е с 58 фигури и 7 таблици. Библиографията включва 469 литературни източника.

Д-р Милена Алексова е магистър по “Медицина”, завършила университет Св. Кирил и Методий, гр. Скопие, Северна Македония през 2018 г. Още през 2018 г. е била на специализация по програма „Еразъм“ в МУ-Пловдив, след което е била около 2 год. общопрактикуващ лекар в Скопие. За 6 мес. е била на следдипломен стаж в Университетска Клиника „Майка Тереза“ в Скопие.

От 12.10.2021г. до сега е редовен докторант в отдел „Имунология“, Национален център по заразни и паразитни болести по докторска програма “Имунопатология и алергология“.

АКТУАЛНОСТ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Едва ли е необходимо да ви убеждавам в актуалността на този труд! Въпреки предшествашите пандемията по-малки епидемии от SARS-CoV и MERS, в условията на COVID-19 пандемията се озовахме внезапно, без предварителни знания и подготовка по клинична и лабораторна диагностика, без специфични познания за вируса-причинител, без специфично лекарствено средство или профилактична ваксина. В хода на

разпространението на вируса и възникналите нови вирусни варианти, предсказващи тежко протичане на инфекцията и смърт, стратегиите ни за диагностика, лечение и профилактика трябваше непрекъснато да бъдат адаптирани. Още от самото начало на пандемията всички усилия на общественото здравеопазване бяха насочени към разбирането на вируса и патогенезата му, разработването на ефективни лечения и, най-важното - създаването и разпространението на ваксини за ограничаване на инфекцията. Пандемията COVID-19 ни показва значението на глобалното сътрудничество в отговор на здравни кризи и необходимостта от мониторинг на инфекциозните патогени с оглед готовност срещу /ново/възникващи инфекциозни заболявания.

Настоящият дисертационен труд представлява първото проспективно проучване на Т-клетъчния имунен отговор, с ударение върху Т-клетъчната имунна памет към SARS-CoV-2 върху статистически достоверни групи от българската популация. Проучването е изключително задълбочено, защото в него се изследват корелации на Т-клетъчния имунитет с:

- тежестта на протичане на заболяването,
- въздействие върху вродения имунитет,
- особеностите на експозиция /след инфекция, след ваксинация и хибридна/,
- съпоставяне с хуморално-свързания имунитет,
- възможен кръстосан протективен ефект със сезонни HCoV,
- еволюционно възникнали вирусни варианти. В резултат на изследванията се демонстрира и практически достъпен и относително независим от вирусната еволюция показател за дългосрочна защита от COVID-19.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е обстоен, подробно разглежда съвременната литература както отнасяща се до структурните, морфологични и антигенни особености на вирус-причинител -SARS-CoV-2, така и на известните към момента на писане на труда данни за въздействието му върху вродения и придобит имунитет, състава и действието на използваните у нас ваксини срещу вируса, вирусните варианти. Специално внимание е отделено на методите за характеризирание на постинфекциозния и поствакциналният Т-клетъчен имунен отговор. Обзорът е и много добре онагледен, което му придава допълнителна достъпност и яснота. В края му са формулирани осем недоизяснени въпроса относно Т-клетъчната имунна памет и именно голямата част от тях съставляват целта и задачите на дисертацията, които приемам напълно.

МАТЕРИАЛИТЕ И МЕТОДИТЕ, оформените групи изследвани лица, биопродуктите, китовете, пептидните мегапулове, обхващащи практически цялата зона на S-протеина и N-протеина съотв. за всички известни вирусни варианти, разтвори, оборудване, статистическите подходи са подробно описани и дават увереност в истиността на получените резултати, а оттам и на изводите. В труда са изследвани 562 пациенти с COVID-19 в различни фази и тежест на заболяването, 158 са контролните пациенти, използвани са 27 фирмени моноклонални антитела за имунофенотипна детекция на 24 субпопулации на Т- лимфоцити.

РЕЗУЛТАТИТЕ са най-интересната част в този дисертационен труд. Подробно, логично и последователно, дисертантката ни показва хода на изследванията си, следвайки поставените задачи и обуславяйки направените изводи.

Обемът на дисертационния труд е твърде голям изследвани са 24 субпопулации, характеризиращи активацията, диференциацията и функционалното състояние на лимфоцитния пул. При този обем ще наблегна на резултатите, показващи връзка с клиничното протичане, прогнозата за усложняване на хода на инфекцията и връзката с Т-клетъчния имунен отговор в зависимост от експозицията /инфекция, ваксинация, хибридна/.

Проведеното най-напред фенотипно характеризиране на броя на Ly (LyAC) по групи с различна тежест на протичане на инфекцията показва интересни данни, дори прогностична зависимост от Treg клетки на CD8+ активирани клетки /Табл. 5,6; Фиг. 13-16/. Така, при пациентите с умерено тежко протичане на инфекцията, при които LyAC варира в широки граници, нарастващият дял на Treg и силно цитотоксичната субпопулация индуцирани Treg/CD39+ би могъл да се използва като предиктивен маркер за последващо усложняване на състоянието при тях. Следователно, **налице е имунофенотипен маркер, който наред с броя на Ly, може бързо и лесно да насочи към настъпващо клинично усложнение.** Това наблюдение е докладвано на 2 национални конференции, предлагам на дисертантката да бъде публикувано и в международно списание. То е в пълен синхрон и с описаното в литературата свърхактивиране на Т-лимфоцитите, по време на тежък COVID-19 и може да причини клетъчно изтощение, придружено с намалена функционалност и променено производство на цитокини.

По-нататък, изхождайки от познанието, че качествата на формираната имунна памет, се определят от концентрациите и съотношенията на различните ефекторни и регулаторни цитокини, секретирани от клетките, участващи в различните фази на имунния отговор, както и от вече съществуващият цитокинов фон, дисертантката търси серумната концентрация на 9 хемокина и 11 цитокина при 47 пациента в рамките на първата седмица на проявата на симптомите и с различна тежест на протичане на инфекцията. Независимо от тежестта на заболяването, всички изследвани хемокини се откриват във всяка изследвана група (фиг.17), демонстрирайки тяхната роля в модулирането на адаптивния имунен отговор. По отношение на цитокините – при тежка форма се наблюдава специфичен цитокинов дисбаланс: значително намалено съотношение IFN- γ /IL-10 и нарастване на съотношението IL-6/IL-10, в резултат на което ефекторната функция на Т лимфоцитите става неефикасна, имунното възпаление не се контролира, а индуцирането на дългосрочна имунна памет е компрометирано. **Този важен оригинален патогенетичен механизъм при тежък Ковид 19 е изведен и като оригинален принос.**

За мене бе от особен интерес използването на активационно-индуцираните молекули, АИМ за детекция на SARS-CoV-2-специфични паметови (в т.ч. стволони паметови) клетки в късните етапи след инфекцията. Интересът ми е продиктуван от “дългия КОВИД” в търсене на патогенетична връзка с предшестваща КОВИД инфекция. Известно е, че след острата фаза на инфекция, в условия на пълно елиминиране на

вируса, се наблюдава значително намаляване на антиген-специфичните клетки в периферната кръв. Ето защо изследването на вирус-специфичните паметови клетки в дългосрочен план, и особено – на малката им стволова субпопулация, изисква високочувствителни методи за детекция. Дисертантката и нейният научен ръководител са въвели алгоритъм за идентифициране на стволови паметови клетки посредством **многопараметърна флоуцитометрия** за изследване на SARS-CoV-2-специфичната дългосрочна имунна памет. Чрез използваните за целта активационно-индуцирани молекули (AIM) се оценяват вирус-специфичните отговори чрез идентифициране и количествено измерване на имунните клетки, активирани след *in vitro* стимулация с подходящи вирус-специфични пептиди от SARS-CoV-2 и неговите варианти (B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.1, C.37, XBB.1, BA.2.86). При това вирус-специфичните CD4+ и CD8+ T отговори се определят поотделно. Така, CD4+T_{SCM}, специфични за S1 антигена, не намаляват значимо повече от 9 мес. след появата на симптомите, за разлика от N- и делта-специфичните CD4+T_{SCM} (фиг.34). Не са открити сигнификантни разлики във времето по отношение вирус-специфичните CD8+T_{SCM}. Важно е, че S1-, N- и делта-специфичните CD8+T_{SCM} са много подобни в дългосрочен план. На базата на тези резултати се допуска, че **AIM+CD8+T_{SCM} могат да служат като чувствителен маркер за дългосрочна протекция срещу COVID-19, независим от еволюцията на вируса и този маркер, както е показано в дисертацията, превъзхожда IFN γ +T, идентифицирани чрез ELISpot.** Приложените резултати са особено важни в контекста на определяне времетраенето на T-клетъчния имунитет и зависимостта му от вирусната еволюция. Тук възниква интересният въпрос за връзка между конвергентната еволюция и малката стволова вирус-специфична субпопулация от паметови клетки - дали тази популация ще липсва при експозиция с нов щам? Тъй като това в момента е непроверимо на модел SARS-CoV-2, предлагам при възможност да се организира такава проверка с модел грипен вирус. Друг въпрос – колко продължително тези субпопулации (CD4+T_{SCM} и CD8+T_{SCM}) е възможно да се самоподдържат в отсъствие на индуциращ антиген и при необходимост – да възстановят целия паметов пул? Например, при дълъг КОВИД, при който в редица случаи се открива части /“сенки“/ от вируса, но не самият вирус – нещо като естествен протеинов пул? Т.е. дали индуциращият антиген в случая е цял вирус или като такъв може да действат и отделни негови компоненти? А фактът, че при повечето донори, заразени с изходния щам, алфа или делта варианта, е налице T-клетъчен имунитет срещу варианти на омикрон, потвърждава косвено вече известната конвергентна еволюция на вируса.

Отличаването на постинфекциозния от постваксиналния и хибридният имунитет е също много важен принос на този труд. За целта е проведено сравнение на T-специфичните отговори, определени по % специфично активирани (AIM+) CD4 и CD8 T клетки (Фиг. 55). Анализът на пуловете от стволови паметови клетки установява по-висок дял общи CD4 T_{SCM} в периферната кръв на донори след хибридна експозиция (ваксина/инфекция), в сравнение с донори след COVID-19 инфекция без данни за имунизация (фиг.56). **Този извод е още едно оръжие при убеждаване за ваксиниране в противовес на схващането за осигуряване на защита само след естествено протичаща инфекция.** На 6-ия и 12-ия месец след експозицията се вижда, че специфичните стволово-паметови пулове от CD4+T_{SCM} намаляват значително по-бързо в циркулацията, за разлика от CD8+T. **12 месеца след експозицията в периферната кръв се откриват сравними нива CD8+T_{SCM}, специфични за S1, N и Делта пептиди,**

независимо от начина на индуцирането им (Фиг. 58). Отново се потвърждава, че SARS-CoV-2-специфичните CD4 и CD8 стволони паметови клетки (SCM) 12 месеца след експозицията са достъпен маркер, отразяващ степента на протекция след предходни срещи с вируса. Този извод е важен от епидемиологична гледна точка за общественото здравеопазване, но и за всички, изследващи ефекта и продължителността на действието на ваксини срещу бързо мутиращи инфекциозни агенти.

Разбира се, на основание на представените данни, възприемам допуснатата от автора възможност за кръстосана протективна роля на предходни инфекции със H1N1 сезонния корона вирус при контактни безсимптомни лица и в съчетание с добре изразен SARS-CoV-2 специфичен CD8 T отговор при липсващи SARS-CoV-2 антитела. **Тъй като по този въпрос литературата не е еднозначна, предлагам тази част от работата да се продължи с по-голям брой участници и обогатен дизайн на изследванията**

Без да се спирам на останалите изследвания и изводи в тази богата дисертация, изразявам съгласието си с тях, както и цялостното си впечатление за много важен, обхванен труд, прекрасно разработен и онагледен, ясно написан и обсъден така, че добре се виждат перспективите за бъдещи изследвания. Именно това е най-ценното в него, без това да означава, че трудът не е завършен и пълен. Просто вирусните инфекции – особено респираторните, предизвикани от остро протичащи РНК-съдържащи вируси, продължават да предизвикват имунната система и науката. Често се говори /например за грипа/, че имунитетът при него е предимно хуморален, последният бързо спада, внушава се едва ли не липса на Т-клетъчен имунитет и т.н. В светлината на изследванията в тази дисертация си струва да се проведе подобно изследване за грип с подходящ дизайн.

Все пак подчертавам основни /макар и не всички/ постижения в този труд – документираното за първи път на ранно нарастване на Т-рег. клетки, значителната дискондартност между двата типа вирус-специфичен адаптивен имуен отговор, хипотезата в резултат на описанието на кръстосаната реактивност, повлияна от предшестваща експозиция на сезонни коронавируси, оригиналният патогенетичен механизъм – цитокиновия дисбаланс, компрометиращ ефекторната функция на Т-Ly, въвеждането и използването на многопараметърната флоуцитометрия, предложеният нов маркер - CD8⁺ Tscm – за дългосрочна защита срещу SARS-CoV-2 и независим от вирусната еволюция.

ОБСЪЖДАНЕТО е ясно, точно написано, демонстрира сериозни и стабилни знания по имунология, но най-важното в него е, че авторът отлично вижда както ограниченията на изследванията си, така и перспективата за бъдеща работа. На места звучи като учебник, без това да е дразнещо.

С ИЗВОДИТЕ и ПРИНОСИТЕ съм напълно съгласна.

АВТОРЕФЕРАТЪТ отразява точно и пълно същността на дисертационния труд, изводите, приносите, препоръките публикациите и участията на автора по темата.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ. Преди всичко – и в дисертационния труд, и в автореферата липсва списък на използваните съкращения, което на места силно затруднява. На места виждам езикови грешки – технически и словоредни – без те да пречат на четенето. Явно е, че Фиг. 1,2 и 6 са собствени, тъй като източниците на останалите в обзора са

посочени. По отношение на текста, подредбата му в раздели нямам забележки. Препоръчвам на автора да побърза с публикуването на всички резултати от изследването си.


ПУБЛИКАЦИОННА ДЕЙНОСТ Въпреки, че е богата, има какво да се желае – бързо публикуване на важни резултати. Д-р Алексова е автор/съавтор в 4 статии – 1 – Q2, IF=3.6; 1 – Q4, IR=0.115; 2 статии поместени съответно в сборник от научна конференция и в Problems..... Тя е участвала и в 5 международни и 12 национални форума с теми по дисертацията. Д-р Алексова е активен колаборатор в 6 проекта по линия на НФНИ, ръководени главно от Зав. Отдела по имунология и алергология и 1 проект, финансиран от МУ-Пловдив.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд с автор д-р Милена Алексова на тема: ПОСТЕКСПОЗИЦИОНЕН И ПОСТВАКСИНАЛЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СРЕЩУ SARS-COV-2 е актуален, иновативен, посветен на важен за науката и общественото здравеопазване проблем, представлява определен принос в инфекциозната имунология, прекрасно написан и онагледен, основните, макар и не всички резултати са публикувани. Трудът отразява и продължава дългогодишните научно-изследователски традиции в Отдела по имунология към НЦЗПБ. Трудът предлага не само нови данни, но показва и перспективи за развитие на имунологичните изследвания по отношение на остропротичащите /или поне започващи с остро протичане/ инфекции, причинени от РНК-съдържащи респираторни вируси. Всичко това, заедно с ми дава основание да предложа на уважаемите членове на научното жури да гласуват положително за присъждането на образователната и научна степен „ДОКТОР“ на д-р Милена Алексова в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, научна специалност „Имунопатология и алергология“.

София, 11.08.2024

РЕЦЕНЗЕНТ:



/Проф. ДМН Радка Аргирова/