

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Георги Стоянов Николов, дм

Национален център по заразни и паразитни болести, София,

отдел „Имунология“, зав. кабинет „Алергия“,

за дисертационен труд за придобиване

на научната степен „Доктор ”

в Национален център по заразни и паразитни болести, София,

отдел "Имунология", Национална референтна лаборатория по имунология

Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Имунопатология и алергология

Автор: д-р Милена Алексова

Тема: **Постекспозиционен и поствакцинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-COV-2**

Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № 189/14.06.2024 г. на проф. д-р Ива Христова, дмн, Директор на НЦЗПБ, на базата на решение на Научния съвет на НЦЗПБ по Протокол № 02/13.06.2024 съм избран за вътрешен член на научно жури за защита на дисертационния труд на д-р Милена Алексова. Въз основа на решение, взето на първото заседание на научното жури, съм определен да изготвя становище по процедурата за придобиване на ОНС „Доктор“.

Представените материали по процедурата са в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, както и с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в НЦЗПБ, София.

д-р Милена Алексова през 2018 г. завършва висше образование в Университет "Св. Кирил и Методий", гр. Скопие, Северна Македония, с квалификация магистър по медицина.

През периода февруари 2018 – юли 2018 е обучавана по програма Еразъм+ в Медицински университет, Пловдив.

През периода 2019 - 2020 г. е общопрактикуващ лекар, гр. Скопие.

От 2021 г. до сега е редовен докторант по програма Имунопатология и алергология в отдел „Имунология“ на Национален център по заразни и паразитни болести, София.

Актуалност на разработваната тема

Коронавирусите представляват постоянна заплаха за човешкото здраве и икономиката. Бързото разпространение на SARS-CoV-2 от 2020 г. е засегнало досега над 774 милиона души и е причинило смъртта на повече от 7 милиона души.

Имунологичният отговор към SARS-CoV-2 вируса зависи най-вече от образуването, активирането и действието на вирус-специфични Т и В-лимфоцити. Развитието на имунологична памет е от съществено значение за овладяване на инфекцията, тъй като създава дълготрайна защита и гарантира по-бърза имунна реакция при повторна експозиция, като по-този начин предотвратява повторно заразяване и/или боледуване. Познаването на тези механизми е условие за разработването и производството на нови, ефективни ваксини, които да обучат имунната система да разпознава и реагира на SARS-CoV-2 и да създаде достатъчно трайна имунна памет. Изследванията на имунния отговор срещу вируса и факторите, които определят качествата на имунната памет са от съществено значение не само в индивидуален план. Те имат определящо значение при разработването на цялостна стратегия за борбата с еволюиращия вирус и овладяването на пандемията.

Имайки предвид всичко това считам, че темата на доктората на д-р Алексова е актуална и е с конкретна практическа насоченост. Докторатът представлява детайлно описание на нейния опит в изучаване на постекспозиционния и поствакциналния Т-клетъчен имуен отговор срещу SARS-COV-2.

Обща характеристика и структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран и написан в научен стил. Отпечатан е на 187 стандартни страници и е онагледен с 58 фигури и 7 таблици.

Включва всички задължителни елементи като: съдържание, използвани съкращения, въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение.

Формулирани са 9 извода и са набелязани 6 теоретични и 4 приложни приноси.

Библиографската справка включва общо 469 източника на английски език, публикувани през последните 10 години.

Оценка на структурните части на дисертационния труд

Литературният обзор е с обем 37 страници. В него изчерпателно са представени съвременни данни за характеристиката, еволюцията и патогенезата на инфекцията със SARS-CoV-2. Описан е подробно постекспозиционния имунен отговор срещу вируса. Анализирани са детайлно актуалните методи за характеризиране на Т-клетъчния имунен отговор и се дискутират механизмите на имунния отговор и появата на Т-клетъчна памет след имунизация.

Обзорът завършва с кратко обобщение на нерешените въпроси относно имунологичната памет към SARS-CoV-2, което ясно представя целта на настоящия дисертационен труд, а именно: "да се изследват възникването, персистирането и функционалните характеристики на SARS-CoV-2-специфичните Т-клетки, индуцирани след инфекция, имунизация или хибридна експозиция".

За изпълнението на поставената цел д-р Алексова е насочила усилията си в разрешаването на 7 задачи, които структурират обоснован подход на проучването.

Добре са описани постановката на изследването, етапите на проучването и използваните методи на изследване. Избраният дизайн позволява успешно изпълнение на конкретните задачи и обезпечава постигането на основната цел на дисертационния труд.

В проучването са включени:

А. 562 пациенти с доказана SARS-CoV-2 инфекция.

- в остра фаза на COVID-19 (по време на хоспитализация и/или < 20 дни след PCR (+) резултат) – 243.
- 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 във времето са, както следва: 124 пациента – двукратно, 41 - трикратно и 12 - четирикратно (средно, съответно, 93, 254 и 378 дни след PCR+ резултат).

Б. Контролни групи:

- 120 лица без данни за прекарана инфекция, ваксинирани срещу SARS-CoV-2.
- 38 клинично здрави лица, без данни за прекарана инфекция, неваксинирани.

Съхранени са изолирани лимфоцити от 279 донора и серум/плазма от 449 донора. Създадена е база от клинично-епидемиологични данни за изследваните пациенти, съдържаща следната информация: дата и резултат от SARS-CoV-2 PCR и /или бърз тест; симптоми и усложнения, тежест на COVID-19, съгласно критериите на СЗО, съпътстващи заболявания и синдроми, ваксинационен статус (приложени дози и тип ваксина).

Подходящо са използвани разнообразни, съвременни клинични, лабораторни и инструментални имунологични методи, които способстват за решаването на задачите от разработката.

Данните от проучването са обработени статистически с подходящи методи за анализ и са онагледени с достатъчен брой фигури и таблици.

Резултатите от всяка задача от проучването са представени в изчерпателен обем и са подходящо илюстрирани, което прави тяхното възприемане лесно и убедително.

Проведеното проучване установи, че абсолютният брой на лимфоцитите (LyAC) е основен критерий за определяне на клиничната тежест на инфекцията с SARS-CoV-2 вирус.

В зависимост от броя на лимфоцитите, пациентите са класифицирани в три подгрупи : Група А – с LyAC в рамките на референтните стойности за здрави контроли (>1100), Група В - с първа степен на лимфопения (LyAC от 1100 до 800 клетки/ μ l), и Група С - с 2-ра и по-голяма степен на лимфопения (< 800 клетки/ μ l).

Установени са значимо по-висок дял на Th1 лимфоцити в група А в сравнение с В и С и нарастване на дела на активираните (CD38+DR+) CD8 Т-клетки. Наблюдаваните понижени нива на хелперни и супресорни Т-клетки, особено при тежките случаи, са белег на нарушен имунен отговор. Наблюдава се и увеличение на наивните хелперни Т-клетки и намаляване на паметовите хелперни Т-клетки, което подсказва за компрометирана имунна защита срещу SARS-CoV-2. Същевременно при пациентите с лимфопения е установено нарастване на Т-регулаторната субпопулация с неспецифична инхибираща активност (CD25hiCD127-CD4+). Тези клетки играят ключова роля за имунопатологичните промени при тежките форми на COVID-19, като потискат ефекторните функции на Т-лимфоцитите, без да ограничат патологичното имунно възпаление. Субпопулацията индуцираните Т-регулаторни клетки (CD39+Treg) отличава пациентите със средно и тежко протичане на COVID-19 и може да се използва като предиктивен маркер.

Тежкото протичане на инфекцията е свързано със специфичен цитокинов дисбаланс: значително намалено съотношение $IFN-\gamma/IL-10$ и нарастване на съотношението $IL-6/IL-10$. Това се отразява на ефекторната функция на Т-лимфоцитите. Имуното възпаление не се контролира, а индуцирането на дългосрочна имунна памет е компрометирано. Съчетаното използване на съотношенията $IFN\gamma/IL-10$ и $IL-6/IL-10$ е подходящо за мониториране клиничния ход на COVID-19.

След 9-ия месец от инфекцията циркулиращите вирус-специфични $IFN\gamma+T$ -клетки намаляват значимо и прилагането на модифициран протокол за стимулиране или маркиране (активационно-индуцирани молекули, AIM) е подходящ метод за детекция на SARS-CoV-2-специфични паметови (в т.ч. стволови паметови) клетки в късните етапи след инфекцията.

Поради по-бързото спадане на титрите на RBD-IgG и IgA липсва корелация между вирус-специфичния хуморален и Т-клетъчен отговор, а значително по-високите стойности на HKU-1 IgG антитела при контактни безсимптомни лица, в съчетание с добре изразен SARS-CoV-2 специфичен CD8 Т-отговор и липсващи SARS-CoV-2 антитела, е доказателство за наличие на кръстосан протективен имунитет вследствие на предходни инфекции с корона вирус.

В сравнение с инфекцията, имунизацията и хибридна експозиция (имунизация след преболеждане) осигуряват значително по-силен RBD-специфичен антитялов отговор, свързан с образуването на по-голям CD4 стволово-паметов (SCM) пул и по-интензивни CD4 S1-отговори.

След 9-ия месец и до 24 месеца след инфектиране при всички изследвани донори се откриват AIM+ Т-клетки, разпознаващи SARS-CoV-2 пептиди. Вирус-специфичните CD4 Т-лимфоцити са с предимно наивен и централно-паметов фенотип, като намаляват по-бързо с времето; вирус-специфичните CD8 Т-клетки са предимно с ефекторен и терминално ефекторен фенотип и се поддържат на по-ниско, но постоянно ниво.

Повече от 12 месеца след инфектиране се откриват паметови CD4 и CD8 Т-клетки, които разпознават варианти, възникнали по-късно и значително дивергирали от индуцирания. Хибридна експозиция стимулира и поддържа стволово-паметовия пул. $CD8+ T_{SCM}$ имат способност за бърза обратна диференциация в ефекторни клетки, като по този начин осигуряват непосредствена защита, независимо от индуцирания ги вариант. Следователно, вирус-специфичните Т-стволови паметови клетки са стабилен маркер на протекция в условията на циркулиращ и еволюиращ SARS-CoV-2.

Получените оригинални резултати от проучването са обсъдени компетентно, като е направен задълбочен анализ и са формулирани съответните изводи.

Дисертационният труд е оформен прецизно и нямам съществени забележки по методологията, представянето на резултатите и техния анализ.

Преценка на приносите, публикациите и личния принос на докторанта

Приемам формулираните приноси и смятам, че те отразяват обективно реалните резултати от проведените проучвания.

Като по-значими оценявам следните приноси:

- Осъществено е първото проспективно проучване на Т-клетъчната имунна памет към SARS-CoV-2 върху статистически достоверни групи от българската популация и е доказано, че ранното нарастване на индуцираните Т-регулаторни клетки (Treg/CD39+) е свързано с по-тежко протичане на SARS-CoV-2 инфекцията.
- 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.
- Демонстрирано е, че SARS-CoV-2-специфичните CD8+ стволкови паметови клетки са достъпен и относително независим от вирусната еволюция показател за дългосрочна защита от COVID-19.
- 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.
- 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.

В автореферата е представен списък на 4 публикации и 17 участия в международни и национални научни форуми, свързани с дисертационния труд.

Като брой и качество, научните трудове надвишават минималните изисквания за ОНС „Доктор“, според Правилника на НЦЗПБ, София.

Автореферат

Авторефератът е написан на 75 страници и е изготвен съобразно изискванията, като отразява точно извършените дисертационни проучвания, резултати и изводи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, докторската дисертация на д-р Милена Алексова отговаря на нормативните изисквания и е резултат от собствената разработка на докторанта. Засяга значим проблем на съвременната медицина, свързан с проучване на постекспозиционния и поствакцинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-COV-2 вирус. Конкретните задачи, които обезпечават постигането на основната цел на дисертационния труд, са изпълнени успешно и получените резултати водят до формулиране на заключения и приноси, които приемам.

Дисертационният труд показва, че д-р Милена Алексова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Дисертационният труд напълно отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ; Правилника за приложение на ЗРАСРБ и съответния Правилник на НЦЗПБ, София.

Всичко изложено до тук ми дава основание да дам положителна оценка за проведеното изследване и предлагам на членовете на уважаемото научно жури, д-р Милена Алексова да бъде удостоена с научната степен „Доктор” по Научна специалност „Имунопатология и алергология”, професионално направление: Медицина.

Изготвил становището:



02. 08. 2024 г.

доц. д-р Георги Николов, дм