

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р МАРИЯ ХРИСТИЯНОВА НИКОЛОВА, д.м.н.,
зав. Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София
на дисертационния труд на Ива Иванова Иванова,
редовен докторант към Институт по Микробиология „Стеван Ангелов“ БАН
на тема: „**Насочване на моделен антиген от грипен вирус към антиген-
представящи клетки чрез генетично конструирани химерни молекули**“
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност
„Имунология“, 01.06.23

Представеният ми за становище труд е посветен на проблем с изключително голямо значение за общественото здравеопазване – превенцията на острата грипна инфекция. По данни на СЗО, по време на ежегодните епидемии се отчитат между 3 и 5 милиона сериозни усложнения и 290 000 - 650 000 случая на респираторна смърт, а отсъствията от работа имат осезаеми икономически последствия. Още по-тежки и масови са последиците от непредсказуемите грипни пандемии. Не случайно СЗО определя като приоритет до 2027 г. разработването на универсална и ефективна противогрипна ваксина.

Настоящият труд предлага конкретни практически решения – прототипи на генно-инженерна ваксина, базирани на моделен антиген от грипен вирус и апробирани в условията миша и човешка имунна система. Няма съмнение, че темата е актуална и значима, както в научен, така и в обществено-икономически аспект.

Дисертационният труд на И. Иванова е развит на 166 страници и следва класическата структура: съдържание, списък на съкращенията, увод - 2 стр., литературен обзор – 40 стр., цел и задачи – 1 стр, материали и методи – 14 стр; резултати - 30 стр., обсъждане 11 стр., изводи, приноси и библиография. Дисертацията е илюстрирана подробно с 40 фигури и 5 таблици. Библиографията е изключително богата и включва 405 източника, като близо половината (48%) са публикувани през последните десет години. От използваните източници само 5 са с българско участие – почти изключително от същия екип.

Уводът целенасочено въвежда в проблема. Литературният обзор е задълбочен и доста обхватен, като разглежда последователно епидемиологията на грипа, молекулярно-биологичните характеристики на причинителя, историята на ваксинологията, видовете ваксии и противогрипните ваксии в частност. Малко повече подробности за характера на епидемиите и ваксиналния обхват у нас през последните години не биха били излишни. (за целта има и много добри публикации на български автори). Добре очертани са недостатъците на противогрипни средства и е обоснована необходимостта от качествено нови препарати с подобрена ефективност. Подробно се разглеждат и всички имунологични структури/феномени, които имат отношение към предмета на дисертацията: рецепторите CR1/2 и FcγRI, едноверижните вариабилни фрагменти на антителата (Fcγ), кръстосаната реактивност на вирус-специфичните CD8 T; отделно е разгледан проблемът за животинските модели - е ключов при апробирането на новите ваксинални препарати. Това, което липсва на обзора, е едно, дори само схематично, представяне на протективния имунен отговор срещу грипния вирус. То би помогнало на читателя да оцени предимствата на конструираните прототипи и да си обясни техните ефекти. Обзорът би спечелил и от едно кратко обобщение в края, обосноваващо и насочващо към целта и задачите на изследването.

Бързам да подчертая, че работата е на изключително високо ниво – като замисъл, като обем и сложност на задачите и като подходи на изпълнение; именно поради това съществува риск за читатели, които не са тесни специалисти в областта на молекулярната имунология, да се „загубят“ без помощта на автора.

Малко необично, докторантката се поставя две цели, макар и по същество доста сходни, и съответно – две групи задачи. Аз лично бих формулирала обща цел – „конструиране и характеризиране на химерни молекули, насочващи моделен антиген от грипен вирус към антиген-представящи клетки“, която да бъде изпълнена с две групи задачи, но това е въпрос на стил. В случая, обаче, за читателя остава неясно какви са мотивите за тези две цели, има ли връзка между двата модела или са напълно независими, защото като обем на методологията и като изпълнение само втората цел е напълно достатъчна за една докторска работа.

Методологията е едно от безспорните предимства на този труд, тъй като обединява молекулярно-биологични и имунологични методи от последно поколение. Екипът, в който докторантката е имала шанса да се обучава, притежава солиден и до

голяма степен - уникален за страната ни опит в създаването и охарактеризирането на генно-инженерни конструкти за модулиране на имунния отговор, както и в апробирането им *in vivo* на подходящи животински модели. Имайки пред вид това, за мен няма съмнение, че докторантката е овладяла на практика всички предклинични етапи от разработването на един нов биопродукт: конструиране и експресия на ДНК-химера и на съответния химерен пептид, охарактеризиране на продуктите *in vitro* (съхранение на епитопите, способност за индуциране на сигнал), и, след прилагане на различни схеми на имунизация и реимунизация, тестване на ефектите им върху имунния отговор *in vivo*, в т.ч.: секреция на вирус-специфични антитела, вирус-специфична цитотоксичност, експресия на цитокини и пр. Особено трудна задача, с която кандидатката се е справила успешно, е осъществяването на хуманизиран модел в NSG мишки. Прави впечатление методичният подбор на всички необходими контролни химери и контролни групи животни. По този начин, независимо от ограничения брой експерименти (което е неизбежно при използвания подход), се достига до достоверни резултати. Към тази част нямам забележки, освен известно преповтаряне на методи отнесени към двете сходни цели (напр. т.10 от част 1 и т.11 от част 2 – ELISpot анализ за установяване на антитяло-секретиращи клетки; т. 12 От част 1 и т. 12 От част 2- Сигнална трансдукция или Тир-fosфорилиране; т.9 от част 1 и т. 10 от част 2 – флуоцитометричен анализ и пр.)

Резултатите са насочени към решаване на задачите, описани са последователно, логично и стегнато и са подходящо илюстрирани. Като най-съществени бих отбелязала следните: и двета конструкта са „работещи“, т.е. - със запазена специфичност на представляващите интерес епитопи и с доказан потенциал за индуциране на положителен сигнал в антиген-специфичните клетки; създаден е подходящ хуманизиран миши модел за оценка на вирус-специфичния имунен отговор, с втория прототип са установени схеми на имунизация, водещи до максимален и балансиран ефект върху хуморалния и клетъчен имунен отговор. Имам въпрос към т.7 и съответната фиг. 23 (стр.100) относно представянето на IP чрез В лимфоцити на IP-специфичните Th: как точно са изолирани CD4+T и В клетки, тъй като това не е описано в методите.

Дискусията е написана стегнато, но отново в „дихотомен“ стил, докато паралелното обсъждане на двета модела би помогнало за правилното възприемане и оценка на резултатите. Според мен въвеждащата част на дискусията (стр. 125 – 128)

донякъде повтаря обзора. Същевременно липсва подробно съпоставяне на използваните подходи и прототипи с публикуваните данни за ДНК-ваксини в процес на проучване – противогрипни или с друга специфичност. Така най-добре биха се откроили оригиналният характер и преимуществата на разработката. Струва ми се, че липсва завършеност в обсъждането и отговор на логичния във времето на „трансляционната имунология“ въпрос: „Какво следва?“ Аз бих попитала докторантката: Как резултатите от първия модел биха послужили при евентуално бъдещо реализиране на противогрипна ДНК-ваксина, възможно ли е комбинирането на двета модела и изобщо каква е визията ви за бъдещето на прототипите.

Приемам изводите, с уговорката, че в извод N4 отпадне „директно“ – доколкото 7G6-IP химерните молекули се свързват по-скоро с IgR-положителните прекурсори на плазмоцитите. Напълно приемам приносите, като подчертавам, че са формулирани много прецизно и изключително скромно.

Считам, че по своето съдържание и структура авторефератът напълно отговаря на изискванията, като отразява изчерпателно и точно съдържанието на дисертацията. Дължна съм да отбележа наличието на доста технически и някои стилистични грешки, които неминуемо правят впечатление в подобен стойностен труд.

Независимо от направените забележки, осъщественият труд е едно стойностно съвременно изследване на европейско ниво и в много отношения надхвърля средното национално ниво. Безспорното признание е публикуването му в международни списания с висок импакт фактор и наличието на две цитирания след 2018 г. Наред с това, резултатите са докладвани на шест международни и седем български научни форума, а образователната програма от докторантурата е изпълнена изцяло.

В заключение: Дисертационният труд на Ива Иванова Иванова е качествена и зряла научна разработка в областта на приложната молекулярна имунология, отличаваща се с оригинален замисъл, отлично техническо изпълнение и реален потенциал за доразвиване до внедряем в практиката продукт. Въз основа на горното препоръчвам убедено на уважаемите членове на научното жури да присъдят на образователната и научна степен “Доктор” на Ива Иванова Иванова.

София, 08.10.2019 год.

РЕЦЕНЗЕНТ: 