

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Фани Георгиева Мартинова, д.м.н.,
Член на Научния съвет на УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“ ЕАД,
Консултант по трансфузионна хематология и клинична имунология
Медицински център „Ориндж“, София
Научна специалност „Хематология и преливане на кръв“

Относно дисертационен труд: за присъждане на ОНС „Доктор“

Област на висше образование: 7. „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление 7.1 Медицина

Докторска програма за придобиване на образователна и научна степен по научна специалност „Хематология и преливане на кръв“, шифър 03.01.39

Автор: Доц. д-р Велизар Стефанов Шиваров

Форма на докторантура: Докторант на самостоятелна подготовка

Научна организация: Клиника по нефрология, хематология и гастроентерология, МУ – Плевен

Тема на дисертационния труд: „Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопротрофиращи неоплазии“

Научни ръководители: Доц. д-р Иван Григоров Гигов, д.м., ВМА София и

Доц. д-р Бисер Кирилов Борисов, д.м., МУ – Плевен

Председател на научното жури:

Доц. Д-р Антонио Иванов Антонов, д.м., МУ – Плевен

Биографични данни за докторанта

Д-р Велизар Стефанов Шиваров е роден на 09 май 1980 г. в гр. Велико Търново. Придобива магистърска степен по медицина през 2003 г. с отличен успех в Медицински факултет на МУ – София. Професионалният и научен път на д-р Шиваров започва като научен сътрудник към Лабораторията по хемопатология и имунология на СБАЛХЗ – София (2004 – 2014). В следващите 4 години е изследовател в Катедра по имунология и геномна медицина, Университет Киото, Япония и постдокторант в Раков център към Медицински факултет на Университет Йейл, Ню Хейвън, САЩ. От 2015 г. постъпва в Отделение по Клинична хематология на УМБАЛ „Софиямед“, последователно като лекар, лекар специалист и лекар – специалист (през 2020 г.) От 2015 г. е началник на Лаборатория по клинична имунология в същата болница. От 2018 г. е доцент в катедра Генетика, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, където понастоящем е хоноруван преподавател. От 2020 г. е Медицински директор – Хематология/Онкология, PRAHS/ICON plc, София, България.

През 2011 г. д-р Шиваров придобива ОНС „Доктор“ в НЦЗПБ, София, с дисертационен труд „Проучвания върху механизма на действие на ензима активационна-индуцируема цитидиндеаминаза (AID) при процеса на изотопно превключване и соматични хипермутации на имуноглобулиновите гени“. През същата година след успешен изпит придобива специалност „Клинична имунология“ (2011). Притежава следдипломна квалификация по Здравен мениджмънт (2014). През 2019 г. придобива втора клинична специалност – „Клинична хематология“. От чужбина: от Университет в Улм, Германия притежава свидетелство за Магистър по Онкология през 2014 г. и ESO Сертификат за компетентност по лимфоми през 2019-2020 г., сертификат по Клинична хематология от European Hematology Association (2018) и статус „завършил“ Колеж на Европейско училище по онкология (2021).

Многобройни са участията на д-р Шиваров в програми за следдипломно обучение и специализации в чужбина: Европейската хематологична асоциация (EHA) - Classical Master Class

(2016-2017), в Университета Джон Хопкинс - специализации по Genomic Data Science (2014-2015) , в Харвард – клинична биология и терапия (2016-2017).

Освен това, в периода 2003-2020 г. е участвал в 14 основни краткосрочни квалификационни курсове, повечето в областта на диагностиката и лечението на малигнените хемопатии, човешките ембрионални стволово-клетъчни култури, флоуцитометрия, РНК анализ - MicroRNA Profiling и др.

Владее отлично английски език, добре немски език и има основни познания по френски език. Има приложни компютърни умения с различни програми, статистика и програмиране.

Членува в български и чуждестранни научни организации в областта на клиничната хематология, имунология, имуногенетика, онкология.

Значимост и актуалност на дисертационния труд

Докторантът д-р Велизар Шиваров, като специалист по клинична хематология, в своите научни търсения и изследвания се насочва към злокачествените хемопатии – остра В-лимфобластна левкемия, лимфом на Ходжкин с лимфоцитно преобладаване, фамилна еритроцитоза и други, при които чрез секвениране търси различни мутации и асоциации с клинични синдроми.

В настоящия дисертационен труд д-р Шиваров тема и обект на изучаването са миелопролиферативните заболявания, които се класифицират като редки хематологични неоплазии. Медицинската значимост на тези заболявания е посочена коректно в увода на дисертационния труд, като д-р Шиваров се позовава и на Европейската пътна карта за бъдещи проучвания в хематологията, която отделя специално внимание и предлага основни насоки за бъдещи изследвания в тази област - на клетъчните и молекулярните механизми, участващи в патогенезата, протичането и терапията на хематологичните неоплазии, генетичното предразположение, хроничното възпаление, избягването на имунния надзор и терапията на тези заболявания. Всичко това показва, че докторантът се е насочил към актуална и значима тема, от гледна точка на съвременната наука.

Структура на дисертационния труд

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд съдържа общо 136 страници, разпределени както следва: титулна страница (1 стр.), общи части (9 стр.), специална част (126 стр.). Титулната страница и общите части коректно отразяват естеството и съдържанието на дисертационния труд. Специалната част е разделена по секции, съгласно общоприетите принципи и специфичните изисквания на ЗРАСРБ, както следва: Увод, Състояние на проблема, Материали и методи, Резултати, Обсъждане, Заключение – основни изводи, Приноси, Приложения, Библиография, Декларация за оригиналност, Публикации.

Дисертационният труд е написан на висок научен стил и на правилен български език, като е онагледен с информативни перфектно разработени 34 фигури и 20 таблици.

Литературен обзор

В литературния обзор д-р Шиваров доразвива собствените си разбирания за биологията на рака, обяснява свои публикувани теоретични постановки, които определят като основна характеристика на рака способността за генериране и поддържане на генетична и епигенетична хетерогенност, позволяваща изключителната адаптивност на раковите клетъчни популации към изменчивостта на микросредата. Специално се разглежда ролята на имунологичния надзор и основните механизми за неговото избягване.

Д-р Шиваров логично се фокусира върху ролята на главния комплекс на тъканната съвместимост у човека - HLA системата, като основен механизъм на придобития имунитет за рестрикция на туморния растеж чрез ефективно представяне на туморни антигени. Дисертантът представя основните положения в познанията за HLA системата, които са необходими за по-нататъшното разбиране на постановките и резултатите на дисертационния труд, както и основни аспекти в патогенезата на миелопролиферативните неоплазии без Филадельфийска хромозома (МПН), въз основа на разгледаните аспекти в биологията и имунологията на рака и

на МПН. Така логично стига до изследователската хипотеза, до формулирането и схематичното представяне на основния изследователски въпрос - дали съществува HLA-медирана рестрикция на ранната онкогенеза при МПН.

Библиографската справка включва 318 литературни източника на английски език, като 63,52% са публикувани в последните 10 години, а от тях 72,65% са от последните 5 години.

Представена е изследователската хипотеза, свързана с възможността HLA генотипът да допринася за развитието на JAK2 V617F+ МПН и съществуването на HLA-медирана рестрикция на ниво МПН стволови клетки, които имат леко пролиферативно предимство и склонност към миелоидна диференциация.

Основната цел на проучването е „да се изследва ролята на класическите имуногенетични фактори HLA-I за развитието на JAK2 V617F+ МПН“.

Изследователските задачи са 8, изцяло аналитични, подробно разписани, съответстват на съвременното състояние на науката и изпълнението им би могло да спомогне за получаване на отговор на основния изследователски въпрос.

Материали и методи

Д-р Шиваров коректно описва основните аналитични методи, които е използвал за изпълнението на изследователските задачи. На практика той подбира популационно генетичен подход, за да получи доказателства за наличието на разлики в HLA клас I генотипа при JAK2 V617F+ МПН пациенти спрямо здрави контроли. Това е правилен подход, тъй като ако хипотезата за HLA-медирана рестрикция на JAK2 V617F+ МПН е вярна, то на популационно ниво трябва да съществува разлика в HLA клас I генотипа.

Д-р Шиваров и проф. М. Иванова повече от 10 години работят върху миелопрлиферативните заболявания, като първоначално са разработили методи за молекулярно-генетичен анализ на мутациите, свързани с тези заболявания. Така през годините те са събрали голям брой JAK2 V617F+ проби геномна ДНК от 139 МПН пациенти и от 622 здрави контролни лица от българската популация, които са генотипизирани и за HLA-I генотипа.

HLA генотипизирането е извършено чрез т.н. секвениране от следващо поколение (NGS), с висока резолюция, а HLA генотипът е определен чрез компютърна програма.

Д-р Шиваров е извършил анализите на данните за генотипа на пациентите и контролните лица на алелно ниво, като детайлно описва статистическите методи за изследване на HLA алелни и хаплотипни асоциативни анализи, допълнителните методи за изследване на еволюционната дивергентност на HLA генотипа, неговата способност потенциално да представя неоантигени, получени от мутантен JAK2 V617F пептид, симулации на молекулната динамика и анализи на генната експресия на различни данни от МПН пациенти и здрави контроли, миши стволови клетки и клетъчни линии. Като цяло, тази секция демонстрира задълбоченото познаване и овладяване от д-р Шиваров на съвременните методи за анализ на големи масиви от биологични данни и очевидно всички анализи са негово лично дело.

Резултати

Разделът за резултатите систематично следва изпълнението на отделните изследователски задачи, като текстът е представен в подпараграфи, които са озаглавени съгласно основните находки при анализа.

1. Д-р Шиваров не намира значими различия по отношение на хетерозиготността, еволюционната дивергентност и способността за представяне на JAK2 V617F неоантигени между пациентите с МПН и здравите контроли.

2. Анализирани са алелни и хаплотипни асоциации с наличието на JAK2 V617F мутация locus по locus, като правилно е извършена корекция по пол и възраст, както е приет и асоциативен модел на влияние на отделните HLA алели. Идентифицирани са три алела, които са значимо по-рядко срещани при пациенти с JAK2 V617F+ МПН, отколкото при здрави контроли - **HLA-A*02:01, HLA-B*35:01, HLA-C*15:02.**

3. Идентифицирани са и потенциално протективни хаплотипи с тези алели, като най-важният е **A*02:01~HLA-B*35:01 (p=0.006)**. Тези данни предполагат наличието на потенциално протективни алели за развитие на JAK2 V617F+ и са първото доказателство в този труд в подкрепа на изследователската хипотеза за HLA—медирана рестрикция на JAK2 V617F+ МПН.

4. Д-р Шиваров предоставя допълнителни доказателства за това, че потенциално протективните алели биха могли да представят директно неопепитопи от JAK2 V617F-мутантен пептид. Чрез използване на сървър на NetMHCIIpan-4.0, прогнозиращ свързването на пептид към всяка молекула МНС II с известна последователност., д-р Шиваров показва, че пептидът LVLNYGVCF би могъл да се свързва с **HLA-B*35:01**, а вторият пептид VLNYGVCF - с **HLA-A*02:01**. Чрез приложение на допълнителни биоинформатични подходи за оценка на потенциала за свързване на **HLA-B*35:01** и **HLA-A*02:01** с двата пептида, получените данни предполагат по-стабилно свързване на **HLA-B*35:01** с LVLNYGVCF, отколкото с VLNYGVCF.

5. Допълнително са извършени биоинформатични анализи на потенциала за получаване на пептида LVLNYGVCF при протеазомното разцепване на ендогенния JAK2 V617F-мутирал белтък, както и на способността за антигенна обработка и за свързване с транспортните TAP белтъци. Така д-р Шиваров предоставя индиректни доказателства, които могат да обяснят, защо **HLA-B*35:01** алелът е потенциално протективен за развитие на JAK2 V617F-медирана онкогенеза.

6. Д-р Шиваров представя серия от анализи на генната експресия на CD34+ стволови клетки от JAK2 V617F+ пациенти с МПН и здрави индивиди. Чрез използване на съвременния анализ Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) той показва, че HLA-I не е с тотално потисната експресия при МПН. Но при различните заболявания, обаче, може да се наблюдава понижена експресия на ключови гени като *TAP1*, *TAPBP*, *HLA-A*, *HLA-B*. Това предполага, че в отделни случаи избягването на имунния надзор при МПН може да се дължи на потисната експресия на ключови компоненти от HLA-I пътя на антигенна обработка и представяне.

7. Много интересни са данните от анализ на генната експресия на SET-2 клетъчна линия след краткосрочно и дългосрочно третиране с JAK2 инхибитор (руксолитиниб). Тези SET-2 клетки имат понижена експресия на *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-G*, *CALR*, *TAP1* и *HSPA5* гените и значимо повишена експресия на *PD-L1* в сравнение с нетретиранията клетъчна линия. Този факт предполага, че дългосрочното третиране с руксолитиниб може да допринесе директно за избягване на имунологичния надзор. Според анализите в дисертацията, подобен ефект на повишена експресия на повечето МНС-I гени и на Cd274 се установява след продължително третиране на миши стволови клетки с IFN- α .

Обсъждане

В тази част д-р Шиваров обстойно доразвива разбиранията си за еволюционното предимство на способността на рака да генерира и поддържа генетично и епигенетично разнообразие, независимо от скоростта и продължителността на този процес. В този смисъл са обсъдени и резултатите от представените данни и анализи, които подкрепят идеята, че в ранната еволюция на JAK2 V617F+ стволови клетки при МПН може да действа HLA-I-медирана рестрикция чрез специфични HLA-I алели, т.е. да съществуват протективни HLA-I алели, които допълнително могат да модулират експресията на някои основни гени от HLA-I пътя така, че допълнително да избягват имунния надзор. Установената по-ниска честота на **HLA-B*35:01** при генотипизирането предполага протективната роля на този алел за развитие на JAK2 V617F-свързани МПН, особено в условията на ниска експресия върху клетъчната повърхност или чрез представяне на неоантигена LVLNYGVCF.

Настоящите анализи показват, че краткосрочното третиране на човешки и миши JAK2 V617F+ стволови клетки с руксолитиниб или с IFN- α , води до повишена експресия на множество гени от МНС-I пътя и повишена експресия на *PD-L1*, особено след лечение. Въз основа на тези наблюдения е предложен модел за HLA-медирана имунна реакция при JAK2 V617F+ МПН,

както и предложение за разработване на ваксини при JAK2 V617F+ МПН, базирани на екзогенни белтъци.

Наличието на **HLA-B*35:01** и **HLA-A*02:01** или други протективни алели може да бъде предиктивен маркер за отговор към имуномодулиращата терапия.

Изводи

Приемам направените заключения и изводи от изпълнението на научно-изследователските задачи. Те отразяват точно направените наблюдения без свръхинтерпретация, а същевременно поставят въпроси и насоки за бъдещи допълнителни изследвания.

Основните изводи са три:

1. Някои HLA алели, като **HLA-B*35:01** могат да рестриктират развитието на МПН с JAK2 V617F+ мутация.

2. Стволовите клетки при МПН могат да избегнат имунна реакция, медирана от HLA системата, като се понижава експресията на молекулите чрез антигенна обработка и представяне чрез HLA клас I.

3. Някои лекарствени средства могат да засилят първичния терапевтичен отговор чрез повишаване на експресията на молекули чрез антигенна обработка и представяне чрез HLA клас I МПН-стволовите клетки.

Приноси

Приемам представените 7 оригинални научни приноси на дисертационния труд и 2 научни приноса с потвърдителен характер.

Предложен е модел на HLA-I-медираната имунна редакция на ранната онкогенеза при JAK2 V617F+МПН.

Публикации

Представените публикации във връзка с дисертационния труд напълно покриват и дори надхвърлят минималните изисквания на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ППЗРАСБ).

Дисертационният труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор" „Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопролиферативни неоплазии“ е **50 точки**.

Три публикации са отпечатани в чуждестранни реферирани и индексирани списания (*Int. J.Immunogenetics, 2021, Experimental Hematology, 2020, Int. J.Clinical and Experimental Medicine, 2019*), като са оценени с **55 точки**, а една глава от автора в книга *Improving Oncology Worldwide, 2022 (единствен автор д-р Шиваров)* е с **20 точки**.

Общият брой точки на д-р Велизар Шиваров е **125 точки** при минимален брой **точки 80**.

Освен това, във връзка с дисертацията, са представени на научни срещи 3 доклада – на Национален конгрес по хематология (2019), на Конгрес на Европейската хематологична асоциация (2020) и на Европейската конференция по имуногенетика и тъканна съвместимост (2020).

Декларация за оригиналност

Авторът декларира, че получените и описани данни са оригинални и са получени в резултат на научноизследователската му работа като доцент по генетика в СУ „Св. Климент Охридски“ по 3 национални научни проекта, финансирани от ФНИ: 1) „Мултидисциплинарен подход за разработване на нов високопроизводителен, течностин, микросферов, „чип“ метод за детекция на мутации, свързани с лимфопрлиферативни заболявания“; 2) „Имуномодулиране на раковите заболявания на неklasическите HLA молекули – MIC“; 3) „Имуногенетични фактори при имунологичния надзор на рака“.

Участие в научни проекти

В периода 2004-2020 г. д-р Шиваров участва в 14 научни проекта (национални, финансирани от МОН, институционални и международни), като всички са свързани с проучвания върху миелопролиферативните неоплазми и различни ракови заболявания.

Патенти на български език,

свързани с директното определяне на мутации в кръвни проби или в костен мозък: **BG1777 (U1)** Средство за директно определяне на мутации в екзон 12 на човешкия JAK2 ген в проби от кръв или костен мозък; **BG1494 (U1)** Средство за *in vitro* определяне на W515A/K/L/R мутации на MPL гена в кръвна проба; **BG1481 (U1)** Средство за директно определяне на **JAK2 V617F мутация** в кръвна проба.

Автореферат

Представеният автореферат в 40 страници представя кратко и точно съдържанието на дисертационния труд. Онагледен е с представителни и атрактивни фигури и таблици, които демонстрират получените резултати, изводи и приноси.

В заключение,

Познавам доцент д-р Велизар Шиваров като професионалист със задълбочени фундаментални и съвременни теоретични познания в областта на клиничната хематология, които са в основата на научните му търсения и практически умения, както и на резултатите от тях в различни, но тясно свързани помежду си други медицински специалности.

Представеният за рецензия дисертационен труд „Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопролиферативни неоплазии“ на доцент д-р Велизар Стефанов Шиваров представлява значителен и оригинален принос в медицинската наука. Това не е изненадващо, като се има пред вид доказаната и продължителна квалификация на дисертанта в областта на хематологията, имунологията и генетиката.

Този научен труд всъщност представлява малка част от дългогодишната научноизследователска програма на д-р Шиваров в областта на хематологичните заболявания и в частност на миелопролиферативните неоплазии. Съвременните научни резултати на автора са публикувани и високо оценени в авторитетни международни списания, с висок Импакт фактор.

Дисертационният труд съдържа важни научни и научно-приложни резултати и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и на Правилника за прилагането му в МУ – Плевен.

Убедено давам положителна оценка на дисертационния труд „Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопролиферативни неоплазии“ и предлагам на уважаемото научно жури да гласува за присъждане на доцент д-р Велизар Стефанов Шиваров образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Хематология и преливане на кръв“.

13.06.2023 г.

Рецензент: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Проф. д-р Фани Георгиева Мартинова, д.м.н.
(трансфузионен хематолог и клиничен имунолог)

REVIEW

By Prof. Dr. Fani Georgieva Martinova, MD, PhD,

Member of the Scientific Council of University Hospital "Pirogov" - Sofia

Consultant in Transfusion Hematology and Clinical Immunology -

Medical Center "Orange", Sofia

Scientific specialty "Hematology and blood transfusion"

Regarding Dissertation: for awarding a PhD degree

Area of higher education: 7. "Health and sports"

Professional direction: 7.1 Medicine

Doctoral program for obtaining an educational and scientific degree in the scientific specialty

"Hematology and blood transfusion", code 03.01.39

Author: Associate Professor Dr. Velizar Stefanov Shivarov

Form of doctoral study: Doctoral student of self-study

Scientific organization: Clinic of Nephrology, Hematology and Gastroenterology, MU – Pleven

Topic: "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasias"

Scientific advisors:

Assoc. Prof. Ivan Grigorov Gigov, MD, PhD - Military Medical Academy - Sofia

Assoc. Prof. Biser Kirilov Borisov, MD, PhD – MU - Pleven

Chairman of the scientific jury:

Assoc. Prof. Antonio Ivanov Antonov, MD, PhD – MU - Pleven

Brief biographical data of the PhD candidate

Dr. Velizar Stefanov Shivarov was born on May 9, 1980 in Veliko Tarnovo. He obtained a master's degree in medicine in 2003 with excellent results at the Faculty of Medicine of the Medical University of Sofia. The professional and scientific path of Dr. Shivarov began as a research assistant at the Laboratory of Hemopathology and Immunology of the SBALHZ - Sofia (2004-2014). In the following 4 years, he was a researcher at the Department of Immunology and Genomic Medicine, Kyoto University, Japan and a postdoctoral fellow at the Cancer Center at the Yale University School of Medicine, New Haven, USA. Since 2015, he joined the Department of Clinical Hematology of the "SOFIAMED" University Hospital, successively as a doctor, a specialized doctor and a specialist doctor in clinical hematology (2020). Since 2015, he is the head of the Laboratory of Clinical Immunology in the same hospital. Since 2018, he has been an associate professor in the Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", and is currently a part-time teacher. Since 2020, he is Medical Director - Hematology/Oncology, PRAHS/ICON plc, Sofia, Bulgaria.

In 2011, Dr. Shivarov was awarded a PhD degree at the National Center for Infectious and Parasitic Diseases - Sofia, with a dissertation "Studies on the mechanism of action of the enzyme activation-inducible cytidine deaminase (AID) in the process of isotope switching and somatic hypermutations of immunoglobulin genes". In the same year, after a successful exam, he acquired the specialty "Clinical Immunology" (2011). He has a postgraduate qualification in Health Management (2014). In 2019, he acquired a second clinical specialty - "Clinical Hematology". From abroad: from the University of Ulm, Germany holds a Master's degree in Oncology in 2014 and an ESO Certificate of Competence in Lymphoma in 2019-2020, a certificate in Clinical Hematology from the European Hematology Association (2018) and Achieved graduate status College of the European School of Oncology (2021).

There are numerous participations of Dr. Shivarov in postgraduate training programs and specializations abroad: European Hematology Association (EHA) - Classical Master Class (2016-2017), at Johns Hopkins University - specializations in Genomic Data Science (2014-2015), at Harvard – Clinical Biology and Therapeutics (2016-2017)

In addition, in the period 2003-2020 he participated in 14 major short-term qualification courses, most in the field of diagnosis and treatment of malignant hemopathies, human embryonic stem cell cultures, flow cytometry, RNA analysis - MicroRNA Profiling, etc.

Dr. Shivarov speaks excellent English, good German and has a basic knowledge of French. Has applied computer skills with various programs, statistics and programming.

He is a member of Bulgarian and foreign scientific organizations in the field of clinical hematology, immunology, immunogenetics, oncology.

Significance and relevance of the dissertation work

Doctoral student Dr. Velizar Shivarov, as a specialist in clinical hematology, in his research and investigations focuses on malignant hemopathies - acute B-lymphoblastic leukemia, Hodgkin's lymphoma with lymphocytic predominance, familial erythrocytosis and others, in which he searches for various mutations through sequencing and associations with clinical syndromes.

In the current dissertation, Dr. Shivarov's topic and object of study are myeloproliferative diseases, which are classified as rare hematological neoplasias. The medical significance of these diseases is correctly stated in the introduction of the dissertation, and Dr. Shivarov also refers to the European Roadmap for future studies in hematology, which pays special attention and offers basic directions for future research in this area - the cellular and molecular mechanisms involved in the pathogenesis, course and therapy of hematological neoplasias, genetic predisposition, chronic inflammation, avoidance of immune supervision and therapy of these diseases. All this shows that the PhD student has focused on a and significant topic from the point of view of the contemporary science.

Structure of the dissertation

The dissertation submitted to me for review contains a total of 136 pages, distributed as follows: a cover page (1 page), general parts (9 pages), special part (126 pages). The cover page and the general parts correctly reflect the nature and content of the dissertation. The special part is divided into sections, according to the generally accepted principles and the specific requirements of local law and institutional regulations, as follows: Introduction, Definition of the problem, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, Contributions, Annexes, Bibliography, Declaration of originality, Publications.

The dissertation work is written in a high scientific style and in the correct Bulgarian language, illustrated with informative and perfectly composed 34 figures and 20 tables.

Literature review

In the literature review, Dr. Shivarov further develops his own understanding of the biology of cancer, explains his published theoretical formulations, which define as the main characteristic of cancer the ability to generate and maintain genetic and epigenetic heterogeneity, allowing the exceptional adaptability of cancer cell populations to the alteration of the microenvironment. The role of immunological surveillance and the underlying mechanisms for its avoidance are specifically considered.

Dr. Shivarov logically focused on the role of the main complex of tissue compatibility in man - the HLA system, as the main mechanism of acquired immunity to restrict tumor growth through effective presentation of tumor antigens. The dissertation presents the basics in the knowledge of the HLA system that are necessary for further understanding of the dissertation formulations and results, as well as basic aspects in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), in the light of the key concepts in the biology and immunology of cancer. Thus, he logically reaches to the research hypothesis, to the formulation and schematic presentation of the

main research question - whether there is a HLA-mediated restriction of the early oncogenesis in MPNs.

The bibliographic reference includes 318 literary sources in English, 63.52% have been published in the last 10 years, of them 72.65% are from the last 5 years.

The research hypothesis related to the possibility that the HLA genotype contributes to the development of JAK2 V617F+ MPN and the existence of HLA-mediated restriction at the level of MPN stem cells, which have a slight proliferative advantage and a tendency towards myeloid differentiation, is presented. high scientific style and in correct Bulgarian language , illustrated with informative perfectly developed 34 figures and 20 tables

The main objective of the study is "to investigate the role of classical HLA-I immunogenetic factors in the development of JAK2 V67F+ MPN". The research tasks are 8, entirely analytical, detailed, correspond to the current state of science and their implementation could help to get an answer to the main research question.

Materials and methods

Dr. Shivarov correctly describes the main analytical methods he used to perform the research tasks. In practice, he selected a population-based genetic approach to obtain evidence for the existence of differences in the HLA class I genotype in JAK2 V617F+ MPN patients versus healthy controls. This is the right approach, because if the hypothesis of HLA-mediated restriction of JAK2 V617F+ MPN is correct, then at the population level there must be a difference in the HLA class I genotype.

Dr. Shivarov and prof. M. Ivanova have been working on myeloproliferative diseases for more than 10 years, initially developing methods for molecular genetic analysis of mutations associated with these diseases. Thus, over the years, they have collected a large number of JAK2 V617F+ samples of genomic DNA from 139 MPN patients and from 622 healthy control subjects from the Bulgarian population, who are also typed for the HLA-I genotype.

HLA genotyping was performed by the so-called Next Generation Sequencing (NGS), with high resolution, and the HLA genotype was determined by a computer program.

Dr. Shivarov has performed the analyses of genotype data of patients and control subjects at the allele level, detailing the statistical methods for the study of HLA allelic and haplotype association tests, additional methods for studying the evolutionary divergence of the HLA genotype, its ability to potentially present neoantigens derived from the mutant JAK2 V617F peptide, molecular dynamics simulations and gene expression analyses of various data from MPN patients and healthy controls, mouse stem cells and cell lines. In general, this section demonstrates Dr. Shivarov's in-depth knowledge and mastery of modern methods for analyzing large sets of biological data, and obviously all analyzes are his personal work.

Results

The results section systematically follows the performance of the individual research tasks, the text being presented in sub-paragraphs which are entitled according to the main findings in the analysis.

1. Dr. Shivarov found no significant differences in heterozygosity, evolutionary divergence and the ability to present JAK2 V617F neoantigens between MPN patients and healthy controls.

2. Allelic and haplotype associations with the presence of JAK2 V617F mutation were analyzed, and a gender and age adjustment was correctly performed, as well as an association model of influence of individual HLA alleles. Three alleles were identified that were significantly less common in patients with JAK2 V617F+ MPN than in healthy controls. ***HLA-A*02:01, HLA-B*35:01, HLA-C*15:02.***

3. Potentially protective haplotypes with these alleles have also been identified, the most important being ***A*02:01~HLA-B*35:01 (p=0.006).*** These data suggest the presence of potentially protective alleles for the development of JAK2 V617F+ and are the first evidence in this work to support the research hypothesis of HLA—mediated restriction of JAK2 V617F+ MPN.

4. Dr. Shivarov provides further evidence that potentially protective alleles could directly represent neoepitopes from a JAK2 V617F-mutant peptide. By using the NetMHCpan-4.0 server, predicting the binding of a peptide to each MHC II molecule with known sequence, Dr. Shivarov showed that the peptide LVLNYGVCF could bind to **HLA-B*35:01**, and the second peptide VLNYGVCF - with HLA-A*02:01. By applying complementary bioinformatics approaches to assess the binding potential of HLA-B*35:01 and HLA-A*02:01 to both peptides, the data obtained suggest a more stable binding of **HLA-B*35:01** to LVLNYGVCF than to VLNYGVCF.

5. In addition, bioinformatics analyses of the potential for obtaining the peptide LVLNYGVCF by proteasome cleavage of endogenous JAK2 V617F-mutated protein, as well as the ability to antigen processing and bind to transport TAP proteins have been carried out. Thus, Dr. Shivarov provides indirect evidence that can explain why **HLA-B*35:01** the allele is potentially protective for the development of JAK2 V617F-mediated oncogenesis.

6. Dr. Shivarov presents a series of analyses of the gene expression of CD34+ stem cells from JAK2 V617F+ patients with MPN and healthy individuals. Using the modern Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), he shows that HLA-I is not totally suppressed in MPN. But in various diseases, however, a decreased expression of key genes such as *TAP1* can be observed. *TAPBP*, *HLA-A*, *HLA-B*. This suggests that in individual cases, avoidance of immune surveillance in MPN may be due to suppressed expression of key components of the HLA-I antigen processing and presentation pathway.

7. Very interesting are the data from the analysis of the gene expression of the SET-2 cell line after short-term and long-term treatment with a JAK2 inhibitor (ruxolitinib). These SET-2 cells have a decreased expression of *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-G*, *CALR*, *TAP1* and *HSPA5* genes and significantly increased expression of *PD-L1* compared to the untreated cell line. This fact suggests that long-term treatment with ruxolitinib may contribute directly to the evasion of immunological surveillance. According to the analyses in the dissertation, a similar effect of increased expression of most MHC-I genes and of Cd274 was established after prolonged treatment of mouse stem cells with IFN- α .

Discussion

In this part, Dr. Shivarov elaborates on his understanding of the evolutionary advantage of cancer's ability to generate and maintain genetic and epigenetic diversity, regardless of the speed and duration of this process. In this sense, the results of the presented data and analyses that support the idea that in the early evolution of JAK2 V617F+ stem cells in MPN can act HLA-I-mediated restriction through specific HLA-I alleles, i.e. protective HLA-I alleles that can further modulate the expression of some major genes of the HLA-I pathway so as to further avoid immune surveillance. The lower frequency of **HLA-B*35:01** in MPNs suggests the protective role of this allele for the development of JAK2 V617F-related MPNs, especially in conditions of low expression on the cell surface or by presentation of the neoantigen LVLNYGVCF.

Current analyses suggest that short-term treatment of human and murine JAK2 V617F+ stem cells with ruxolitinib or with IFN- α results in increased expression of multiple genes from the MHC-I pathway and increased *PD-L1* expression, especially after treatment. Based on these observations, a model for HLA-mediated immune response in JAK2 V617F+ MPN is proposed, as well as a proposal for the development of vaccines in JAK2 V617F+ MPN based on exogenous proteins.

The presence of **HLA-B*35:01** and **HLA-A*02:01** or other protective alleles may be a predictive marker of response to immunomodulatory therapy.

Conclusions

I accept the conclusions drawn from the implementation of the research tasks. They accurately reflect the observations made without overinterpretation, while at the same time raising questions and directions for future further research.

The main conclusions are three:

1. Some HLA alleles, such as HLA-B*35:01 may restrict the development of MPN with JAK2 V617F+ mutation.

2. Stem cells in MPN can avoid an immune response mediated by the HLA system by downregulating the expression of molecules through antigen processing and presentation through HLA class I.

3. Certain drugs can enhance the primary therapeutic response by increasing the expression of molecules through antigen processing and presentation by HLA class I MFN-stem cells.

Contributions

I accept the presented 7 original scientific contributions of the dissertation and 2 scientific contributions of a confirmatory nature.

A model of HLA-I-mediated immune editing of early oncogenesis in JAK2 V617F+MPN is proposed.

Publications

The publications presented in connection with the dissertation fully cover and even exceed the minimum requirements of the Regulations for the Implementation of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (PPZRASB).

The dissertation work for awarding the educational and scientific degree "doctor" "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasias" is **50 points**.

Three publications were printed in foreign refereed and indexed journals (*Int. J. Immunogenetics*, 2021, *Experimental Hematology*, 2020, *Int. J. Clinical and Experimental Medicine*, 2019) and were evaluated with **55 points**, and one chapter by the author in a book *Improving Oncology Worldwide*, 2022 (single author) is c **20 points**.

The total number of points of Dr. Velizar Shivarov is **125 points** with a minimum number of **80 points**.

In addition, in connection with the dissertation, 3 reports were presented at scientific meetings - at the National Congress of Hematology (2019), at the Congress of the European Hematology Association (2020) and at the European Conference on Immunogenetics and Tissue Compatibility (2020).

Declaration of originality

The author declares that the data obtained and described are original and were obtained as a result of his research work as an associate professor of genetics at SU "St. Kliment Ohridski" for 3 national scientific projects funded by the National Institute of Scientific Research: 1) "Multidisciplinary approach for the development of a new high-throughput, liquid, microsphere, "chip" method for the detection of mutations associated with lymphoproliferative diseases"; 2) "Immunomodulation of cancers by non-classical HLA molecules - MIC"; 3) "Immunogenetic factors in the immunological surveillance of cancer".

Participation in scientific projects

In the period 2004-2020, Dr. Shivarov participated in 14 scientific projects (national, funded by the Ministry of Education and Culture, institutional and international), all of which were related to studies on myeloproliferative neoplasms and various cancers.

Patents in Bulgarian related to the direct determination of mutations in blood samples or in bone marrow: **BG1777 (U1)** Means for direct determination of mutations in exon 12 of the human JAK2 gene in blood or bone marrow samples; **BG1494 (U1)** Agent for in vitro determination of W515A/K/L/R mutations of the MPL gene in a blood sample; **BG1481 (U1)** Agent for direct determination of JAK2 V617F mutation in a blood sample.

Dissertation synopsis

The presented Dissertation synopsis in 40 pages briefly and accurately presents the content of the dissertation work. It is illustrated with representative and attractive figures and tables that demonstrate the obtained results, conclusions and contributions.

In conclusion,

I know Assoc. Prof. Dr. Velizar Shivarov as a professional with deep fundamental and modern theoretical knowledge in the field of clinical hematology, which is the basis of his scientific research and practical skills, as well as their results in different, but closely related medical specialties.

The dissertation "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasias" of associate professor Dr. Velizar Stefanov Shivarov represents a significant and original contribution to medical science. This is not surprising, given the Dissertant's proven and longstanding qualifications in hematology, immunology and genetics.

This scientific work actually represents a small part of Dr. Shivarov's long-term research program in the field of hematological diseases and in particular myeloproliferative neoplasias. The author's modern scientific results have been published and highly evaluated in authoritative international journals with a high Impact Factor.

The dissertation contains important scientific and scientific-applied results and meets all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ZRASRB) and the Regulations for its implementation at the MU – Pleven.

I confidently give a positive assessment of the dissertation work "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasias" and propose to the respected scientific jury to vote for awarding associate professor Dr. Velizar Stefanov Shivarov the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Hematology and blood transfusion".

13.06.2023

Sofia

Reviewer: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Prof. Dr. Fani Georgieva Martinova, MD, PhD
(transfusion haematologist and clinical immunologist)