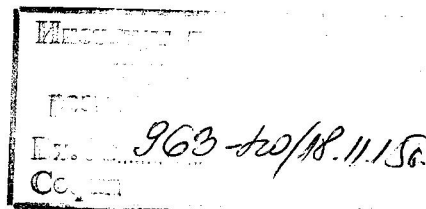


РЕЦЕНЗИЯ



от доцент Петя Асенова Димитрова, PhD, Департамент по имунология,
Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, БАН

член на Научното жури, определено с решение на Научния съвет на Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ – БАН (ИБИР-БАН) с Протокол № 45/27.10.2015 и със заповед № I - 396/28.10.2015г на Директора на Института.

Относно: Дисертационен труд за защита и придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, по Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“, По научна специалност: „Имунология“ - 01.06.23.

Тема на дисертационния труд: „Антиген-представящи и регулаторни функции на В-лимфоцитни субпопулации“

Автор на дисертационния труд: Шина Иванова Пашова, редовен докторант в секция „Молекулярна имунология“ към ИБИР - БАН

Научни ръководители: доц. Анастас Пашов, MD, PhD и доц. Милена Мурджева, MSc PhD

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

В лимфоцитите са ключов елемент от придобития имунитет. В последните години се установи, че тяхната роля не е просто свързана със синтез на имуноглобулини, но и с възможността активно да регулират силата и посоката на имунния отговор. Най-голям интерес представляват така наречените транзитивни В лимфоцити, открити в слезката. Те са краткоживущи клетки, но могат да представляват ключов отрицателно контролно-пропускателен пункт за подбор на автореактивни В клетки и за генериране на полиспецифични антитела. Те са идентифицирани при пациенти с лупус и при пациенти с имунна недостатъчност. Следователно, разбирането на биологията на транзитивните В клетки би имало важни последици при изясняване на нови механизми за имунен толеранс, автоимунитет и имунна компетентност.

Структура на дисертационния труд:

Представеният за защита дисертационен труд е структуриран на секции в 106 страници съобразно общоприетия модел: Заглавна страница, Използвани съкращения - 1 стр, Съдържание - 1 стр, Увод - 2 стр, Литературен обзор - 34 стр, Цел и задачи - 1 стр, Материали и методи - 6 стр, Резултати - 29 стр, Дискусия със заключение - 8 стр, Изводи - 1 стр, Публикации във връзка с дисертацията – 1 стр., Литература – 15 стр. Използвани са източници от 233 публикации и 3 учебника, като 32% от тях са публикувани след 2009 година. Липсва литература на кирилица. Дисертацията е онагледена с 2 таблици и 23 фигури.

Уводът на дисертацията аргументира причината за написването и, а именно, че В лимфоцитите могат да бъдат силно пластични и да съществуват под формата на различни субпопулации, които по специфичен начин биха могли да насочат и регулират силата на имунния отговор. Тази тяхна способност може успешно да се използва при лечение на инфекциозни, туморни и автоимунни заболявания

Литературният обзор е сбит, но интересен и се чете с лекота. Той предлага сериозен, коректен преглед на литературата и показва добро познаване на изследванията по темата от докторантката. Разделен е на тематични секции, обхващащи: обща характеристика на В лимфоцитите и на В лимфоцитните субпопулации, антиген-представяща и регулаторна функция на В лимфоцитите, имунотерапевтични подходи и В лимфоцити. Отделните теми следват логично и предлагат градация, необходима за формулиране на целта. В литературния обзор са използвани 2 фигури и 2 таблици. Много полезна е информацията, представена в Таблица 2 за фенотипа и функциите на миши и човешки В клетки с регулаторни функции. Сравняване и разграничаване на мишите и човешките В клетки е важно с оглед на потенциала им за лечение. В литературния обзор са спазени стриктно принципите за правилно цитиране, като не се наблюдават неточно поставени цитати или пък т. нар. „скрито цитиране“. Приятно впечатление прави и използването на литературни източници от последните няколко години.

Критики към литературния обзор:

- при цитирането не е използван българския стандарт, според който се посочва в текста името на първия автор и годината на публикуване, а не цифра;
- не са посочени източници на кирилица.

Целта е ясна, а именно да се изследва регулаторната функция на транзитивните В клетки и на В-1 лимфоцитите. Адекватно са поставени **5 задачи**. Те са формулирани в определена последователност – изолиране на В лимфоцитните субпопулации, оценяване на ефекта на субпопулациите върху Т клетъчната пролиферация и продукцията на цитокини, сравнение на антиген-представящите функции между отделните субпопулации, изследване на участието на В-1 лимфоцитите в механизмите, задвижени след прилагане на модифицирани имуноглобулинови препарати при експериментален модел на сепсис. Това дава възможност опитните постановки да се поставят правилно за решение на съответната задача.

Критики към целта и задачите: няма

Оценка на използваните материали и методи на изследване: В настоящата дисертация са използвани и усвоени разнообразни методи: за изолиране от слезка и пречистване на клетки чрез градиентно центрофугиране, позитивна и негативна селекция, сортиране; за клетъчно ко-култивиране; за фенотипизиране и оценка на ефекторни функция и пролиферация чрез проточна флоуцитометрия; за модифициране на имуноглобулинови препарати и прилагането им при експериментален модел на сепсис. Бих отличила старанието на докторантката да оптимизира изолирането на редките В лимфоцитни субпопулации. Според мен тя представя нова стратегия, с методологичен принос, базирана на специфично редуване на негативна и позитивна селекция. Макар и на пръв поглед системата за ко-култивиране между Т клетки с различни субпопулации от В лимфоцити да е рутинна, тя е времеемка, защото изисква координация при пречистването на клетките, предварително уточняване на съотношението между клетките, начина на стимулиране и др. Докторантката се е справила добре с тези трудности. Тя се стреми да използва коректно избрани контроли – от алогенни спленоцити, контрола В лимфоцити, контрола за позитивна Т клетъчна пролиферация, изотипни контроли и т.н. Докторантката показва и добро познание за статистика, като използва адекватни

математически модели при сравнение на параметрични или непараметрични данни, което гарантира репродуктивност на получените резултати.

Критики:

- методите са описани кратко. Това е позволено, но при посочване на първоизточник, където методите са описани по-подробно.
- споменато е оптимизиране на концентрациите на антителата при проточна флоуцитометрия, но липсват точните стойности, използвани в експериментите, липсват и подробности за конюгирането на антителата с флоурохроми.

Оценка на получените резултати:

Резултатите са обобщени в подраздели, съобразно поставените задачи. Те включват 20 фигури. Докторантката разделя В клетъчните субпопулации според експресията на CD21 и CD23. От CD93+ сортира T1 и T2 В лимфоцитите, а от CD93- сортира FO и MZ В лимфоцити. В смесена лимфоцитна култура, MZ В за разлика от FO В лимфоцити увеличават пролиферативната активност на Т клетките. Значение обаче има и селектирането на респондерите по CD3 и CD5. Това е важен елемент понеже ефекторните и регулаторни Т клетъчни популации имат различна динамика на делене и експресия на цитокини. Докато T1 В лимфоцитите намаляват пролиферативната активност на Т клетките и повишават продукцията на IL-10, T2 В лимфоцитите стимулират Т клетките към делене, но не и към продукция на IL-10. Докторантката демонстрира елегантно антиген-представящи функции на В лимфоцитите. Тя установява, че само наивни В клетки свързват FITC-конюгиран OVA, но не и биотинилирани антигени, както и че OVA-FITC се свързва най-добре от T2, MZ, В-1 клетки. Съответно T2 клетките успяват да индуцират OVA-специфична IL-10 продукция и да забавят Т клетъчната пролиферация. Тези резултати са с важен принос, тъй като те показват, че удължаването на живота и/или увеличаването на броя на T1 В клетките може да коригира недостатъчна IL-10 продукцията в Т клетки. Изследваните в дисертацията IRA В-1 лимфоцити са сравнително нова популация, охарактеризирана едва през 2012 година. В тази връзка резултатите получени от докторантката, са необходими и значими. Тя показва, че инхибирането на IRA-B1 от имуноглобулинови препарати е важно за преживяемостта при сепсис и очертава нова рамка за успешна терапевтична стратегия.

Критики: На фиг. 6/стр.55 би могло за яснота да се постави легенда, която да описва различните стратегии за сортиране на респондерите.

Въпроси:

1. Присъствието на T1 В лимфоцити има по-слаб ефект от зрелите MZ върху Т клетъчната пролиферация. Възможно ли е този ефект да се дължи на ускорена апоптоза на T1 В клетките при сравнение с MZ в рамките на култивационния период от 7 дни?
2. На какво би могло да се дължи сравнително ниската IFN-g продукция в Т клетки от BALB/c мишки?

3. Има ли данни в литературата за избирателност между T1 и T2 клетките по отношение на способността им да активират наивни и паметови T клетки?

4. Възможно ли е ефектите на T1 върху IL-10 продукцията на T клетките да се повиши при промяна на съотношението между B клетки и респондери?

Дискусията е стегната, задълбочена, критична и получените данни в дисертацията са обобщени във фигура. Тя показва придобитото умение на докторантката да анализира данните и да изгражда хипотези. Формулирани са 6 извода.

Критика: Считам, че извод 6 според формулировката е по-скоро принос.

Оценка на Автореферата: Авторефератът е добре-оформен графично и в съответствие с дисертацията, като отразява целта и задачите, проведените изследвания, получените резултати с дискусия, направените изводи. Той включва справка за направените приноси и данни за научната активност на докторантката.

Критика: Не е предоставена информация за цитатите. Въпреки, че това не е изискване за автореферат, то дава допълнителна представа за научния принос на резултатите.

Биографични данни според приложените документи и публикационна активност: Шина Иванова Пашова е представила всички необходими по процедурата документи на хартиен и електронен носител в съответствие с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности-БАН и е представила за дискусия резултатите си и проекта си за дисертация на семинар на 22.10.2015 в ИБИР-БАН.

Според предоставената автобиография, Шина Иванова Пашова е магистър по „Генно и клетъчно Инженерство“, специалност, която тя придобива в Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Св. Климент Охридски“ през 2009. От 2010 година е редовен докторант към ИБИР. Има трудов стаж и натрупва допълнителен експериментален опит в молекулярно-генетичния анализ при работата си в Специализирана Болница за Активно Лечение на Детски Болести ЕАД.

Резултатите, от дисертацията са включени в две публикации. Едната публикация, засягаща резултатите с IRA B клетките при сепсис, е в списание *Autoimmunity Reviews*, и е публикувана в специален брой на тема „Natural Antibodies in Health and Disease“ с редактор Dr. Sylvia Miescher. Списанието е с ИФ 7.933 за 2014 и с 5.959 за периода от 5 години. Безспорно публикация в това списание е значителен успех и води до разпознаваемост на работата. При справка, за броя на цитатите бяха открити 8 цитата в SCOPUS и 10 в Google Scholar, отново в добри и признати международни списания, като *J Leukocyte Biology* и *Autoimmunity*. Втората статия, е в *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* (Доклади на БАН) с ИФ 0.284. Въпреки по скромното представяне на резултатите, свързани с изолиране на B клетъчните субпопулации, при търсене в Google Scholar се открива информация, свързана с тази статия, а именно Награда ImmunoTools IT-Box-Cy55M през 2013, получена от Шина Пашова. Тази награда се дава за извършване на специфична експериментална дейност – в случая изолиране на B клетъчни субпопулации, чрез използване на нови консумативи и иновативни технологии, които все още пробиват на пазара. Използваните от докторантката консумативи, в момента са високо-търсени продукти с приложение при идентифициране на редки имунологични клетъчни популации.

Докторантката има 5 участия, от които 1 е презентация и 4-ри са с постери. Печели престижна тримесечна стипендия от EFIS (European Federation of Immunological Societies) за извършване на експериментална работа в INSERM, Paris, Франция на тема, свързана с настоящата дисертация, което безспорно и дава възможност за израстване и натрупване на методологичен опит и опит при работата в колектив.

Придобита компетентност съобразно изискванията на образователната и научна степен „Доктор“: въз основа на събраните кредити докторантката е изпълнила успешно предвидената образователна и научна програма. От дисертационния материал се вижда, че Шина Пашова е развила следните компетентности, необходими за присъждане на *образователна степен*: теоретична подготовка, методологични познания и опит при планиране на експериментите, самостоятелност и задълбочен анализ на резултатите, съчетан с умения за работа със специфични софтуерни пакети (за проточна флоуцитометрия FCS Express™ Diva, Cyflogic, Flow Jo™) и за статистическа обработка на данните. Компетентностите, свързани с присъждане на *научна степен* са: добре-подредена дискусия, публикационната активност, участие в проект, FP7-PEOPLE-2009-RG248289, подкрепящ реализирането на настоящата дисертация и представянето на резултатите на научни форуми. Прави впечатление, че освен публикациите по темата Шина Пашова има и 3 други публикации в признати международни списания (American Journal of Reproducible Medicine, Frontiers in Bioscience).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отправените от мен критики към всеки раздел се резултат от малки неясноти, които обаче не омаловажават значимостта на дисертационния труд. Те не променят валидността на резултатите и изводите. Напротив, считам, че дисертацията по съдържание и актуалност отговаря на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ и вътрешните правилници на БАН и Института. Оценявам го положително и убедено препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на Шина Иванова Пашова.

П. Димитрова

17.11.2015, София