

**СТАНОВИЩЕ**

От проф. д-р МАРИЯ ХРИСТИЯНОВА НИКОЛОВА, д.м.н.,  
зав. Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София  
на дисертационния труд на Шина Иванова Пашова, редовен докторант в ИБИР при  
БАН

на тема: **„АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЯЩИ И РЕГУЛАТОРНИ ФУНКЦИИ НА  
В-ЛИМФОЦИТНИ СУБПОПУЛАЦИИ”**

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност  
„Имунология”, 01.06.23

Представеният ми за становище труд е съвременна експериментална разработка, в която с помощта на *in vitro* и *in vivo* модели се търси отговор на значими въпроси от теоретичната имунология с потенциално практическо и клинично приложение. През последните 30 години клетъчната имунология търпи интензивно развитие, свързано с левкоцитното типизиране и характеризирането на имунните отговори на субпопулационно ниво, като Т-лимфоцитите определено са били обект на по-голямо внимание. Същевременно, В-лимфоцитите се очертават като изключително интересен и ключов елемент на имунния отговор, отдавна надхвърлил ограниченото определение „ефектори на адаптивния хуморален имунитет”. На преден план излиза регулаторната им функция, както по отношение на адаптивния, така и - на естествения имунен отговор. Практическото значение на този тип изследвания се определя от терапевтичния потенциал на регулаторните механизми в две насоки – стимулиране на неефективни отговори (туморен имунитет, хронични инфекции) и овладяване на нежелани реакции (автоимунитет, отхвърляне на трансплантат, неконтролируемо възпаление). Най-съществените „бели полета“ в областта са свързани с дефинирането на конкретни В-клетъчни субпопулации и тяхната физиологична роля, идентифициране на подлежащите молекулни механизми и възможността за използването им като терапевтични мишени в контекста на човешката патология. Един показателен пример е терапията с интравенозни имуноглобулини (ИВИг), която добива все по-широка популярност, без да е намерила изчерпателна научна обосновка.

Основна цел на настоящия труд е да се изясни регулаторната функция на две конкретни В-лимфоцитни субпопулации (съответстващи на различни стадии и линии на В-клетъчната диференциация), транзитивни В клетки тип 1 и В-1 преплазмабласти

при мишка. По обясними причини авторите са избрали контекста на мишата имунна система, като коректно правят уговорката, че наблюденията и резултатите не са автоматично валидни при хора. Въз основа на казаното по-горе определям целта като много актуална и считам, че авторите до голяма степен са я постигнали, като им остава и не малък резерв за разгръщане на тематиката.

Дисертационният труд на Ш. Пашова е пестеливо развит на 101 страници, като структурата и пропорциите отговарят на изискванията: съдържание, списък на съкращенията, увод - 2 стр., литературен обзор – 34 стр., цел, задачи, материал и методи – общо 7 стр.; резултати - 30 стр., обсъждане - 7 стр., изводи и библиография. Дисертацията е илюстрирана с 24 фигури и 2 таблици. Библиографията включва 236 източника, като 53 % са публикувани през последните десет, а 21% - през последните пет години. От използваните източници само 4 са с водещи български автор и нито един - на български език.

Уводът целенасочено въвежда в проблема. Литературният обзор е структуриран и разглежда последователно: общите и субпопулационни характеристики на В клетките, тяхната антиген-представяща функция (която също би могла да се разглежда като регулаторна!), регулаторната функция *sensu stricto* и различни механизми, по които се осъществява, имунотерапевтични подходи, ангажиращи В-лимфоцитите. Според мен последната част би могла още да се обогати, като се има пред вид, че смисълът на подобни експериментални проучвания в крайна сметка е постигането на определени клинични цели в условията на човешкия организъм. Във връзка с това не би била излишна и по-подробна информация за човешките аналози на изследваните субпопулации (известен опит е направен в Табл.2).

Целта, коментирана по-горе, би могла да се формулира стилистично по-добре, като „Изясняване на регулаторната функция на транзитивни В клетки тип 1 и на В-1 преплазмабласти с помощта на *in vitro* и *in vivo* модели модели при мишка” (сега оставаме с впечатление, че моделът „контрол на сепсис чрез ИВИг“ е използван за характеризирани и на двете популации.) Петте задачи са методологично изчерпателни.

Методологията е една от безспорно силните страни на този труд, като съчетава много добре подбрани и контролирани *in vitro* и *in vivo* модели, съответни опитни животни и методи от последно поколение за изолиране и функционална оценка на лимфоцитните субпопулации. Особена тежест има клетъчното сортиране. Реализирана е успешно доста сложна система на последователни селекции, която дава възможност за обективна диференцирана оценка на всяка една от изследваните субпопулации.

Личните ми впечатления от докторантката са, че е добре запозната и е участвала пряко във всички етапи на експерименталната работа. Забележките ми са с технически характер: след сортиране би трябвало да се демонстрира чистотата на получените популации; тъй като работата е изпълнена в различни лаборатории, добре е това изрично да се уточни; не става ясно по какъв критерий интензитетът на CellTrace™ Violet-флуоресценцията се дефинира като съответна на „5 и повече” и на „по-малко от пет” деления, изключени ли се от аналитичния прозорец на фиг. 5 стимулиращите В лимфоцити?

Резултатите са насочени към решаване на задачите, описани са последователно и логично и са подходящо илюстрирани. Като най-съществени бих отбелязала следните: реализирани са подходящи методологични подходи за изолиране и сравнителна оценка на таргетните субпопулации; уместно са подбрани две *in vitro* системи: Т-клетъчна стимулация с алогенни В-лимфоцити като модел на първичен имунен отговор и разпознаване/представяне на FITC хаптен (OVA-FITC) от В-клетки към CD4 Т клетки като модел на антиген-специфичен отговор, изискващ активиране на представящите В лимфоцити (и при двата модела отговорът е поликлонален и лесно се проследява); установени са съществени разлики в ефектите на изследваните В-клетъчни субпопулации върху Т-клетъчната пролиферация и диференциация. С изразен толерогенен потенциал (индукция на IL-10, и намалена Т-клетъчна пролиферация) са Т1 транзитивните В-клетки и пре-плазмабластите, докато MZ В-клетките са най-добрите индуктори на Th1 отговор. T2 В лимфоцитите могат да индуцират, както и да инхибират Th1 отговор, в зависимост от контекста на имунната реакция (тип антиген, микросреда и пр.); при определени условия MZB също могат да проявят толерогенност. Убедително е демонстриран приносът на В-1 лимфоцитите за овладяване на септично състояние и синергизма им с модифициран ИВИг в модел *in vivo*. Предложено е обяснение на този ефект въз основа на резултатите, получени *in vitro*: мИВИг в присъствие на LPS стимулират допълнително диференциацията на В-1а клетките към IRA В. Като обобщение на този експериментален анализ, авторите предлагат една много логична концепция за ролята на различните В лимфоцитни субпопулации при регулирането на имунния отговор по посока на толерогенност или възпаление (фиг.24).

Дискусията е написана стегнато и логично, но известно разгръщане определено би обогатило труда. Въпреки, че работата е изпълнена на миши модели, естествено възниква въпросът до колко резултатите биха намерили приложение в контекста на човешката имунология и имунопатология, особено пред вид наличието на

„съществени разлики ..които налагат внимателно отнасяне на резултатите от мишите модели към човека”. Аз бих попитала авторката дефинирани ли са човешките аналози на T2 В и В-1а лимфоцитите и какво показват изследванията върху техния регулаторен потенциал. Не мога да не отбележа наличието на доста технически грешки в текста, които нямат място в подобен качествен труд.

Независимо от направените забележки, определям докторската работа на Ш. Пашова като стойностно съвременно изследване, което отговаря на европейските критерии за докторска дисертация и напълно приемам формулираните от авторката приноси. От теоретична гледна точка най-ценен е изводът за „хетерогенност на регулаторната функция”, т.е. - различни популации и стадии на диференциация на В клетките, при определени обстоятелства могат да проявят контролни функции и да променят посоката на имунните отговори. Непосредственият практически принос на тези резултати е възможността за диференциране на имунотерапевтичните подходи, основаващи се на регулаторните ефекти на В-лимфоцитите, което би било гаранция за клиничния им ефект.

**Заключение:** Представеният ми за становище дисертационен труд е качествена и зряла научна разработка в областта на експерименталната клетъчна имунология, отличаваща се с оригинален замисъл, отлично техническо изпълнение и голям потенциал за доразвиване в контекста на човешкия имунен отговор. Нямам забележки към автореферата. Изпълнени са всички съответни изисквания на правилника на ИБИР и ЗРАСРБ. Въз основа на всичко това си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на научното жури да гласуват положително за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” на г-жа Шина Иванова Пашова.

София, 12.11.2015 год.

РЕЦЕНЗЕНТ:

