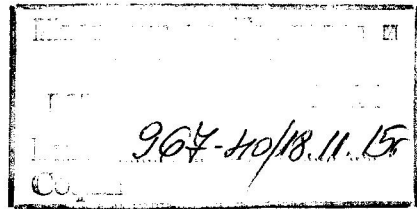


## РЕЦЕНЗИЯ



от проф. д-р Магдалена Иванова Чорбаджиева

Катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ "Св. Кл. Охридски"

на дисертационния труд на **Шина Иванова Пашова** на тема "**Антиген-представящи и регулаторни функции на В-лимфоцитни субпопулации**", представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Имунология“, направление 4.3. Биологически науки.

Шина Пашова е родена на 16.08.1983 г. Тя е възпитаник на БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“, откъдето през 2006 г. получава бакалавърска степен по „Биотехнология“, а през 2009 г. - магистърска степен по „Генно и клетъчно инженерство“. От 2010 г. е редовен докторант в секция „Молекулярна имунология“ към ИБИР-БАН.

### Значение и актуалност на изследването

В-клетките играят разнообразни роли както във вродения имунитет чрез продукцията на естествени антители, насочени към Т-независими антигени, така и в придобития имунитет чрез тяхната диференциация в плазмени В клетки и клетки на паметта, които продуцират високоафинитетни антители, насочени към Т-зависими антигени. Така В клетките позитивно регулират имунните отговори и възпалението чрез продукцията на антители и антигенно представяне за оптимално CD4<sup>+</sup> Т-клетъчно активиране. Същевременно, чрез секретирание на автоантители и антигенно представяне, те са в центъра на патогенезата на много автоимунни заболявания. През последните години бяха идентифицирани специфични и функционално важни В-клетъчни популации с негативни регулаторни свойства (означавани като Bregs), които допринасят за имунологична толерантност чрез потискане на имунните отговори при хомеостатични, както и възпалителни и патогенни условия чрез синтеза на IL-10 и други цитокини. Тези клетки станаха прицел за изучаване на автоимунни, инфекциозни и онкологични заболявания в опит за генериране и предлагане на алтернативни терапии, базирани на имуномодуляция. В-клетките са пластични по отношение на способността си да активират или потискат имунния отговор, което се дължи на наличието на функционално различни В клетъчни популации. Регулацията на имунния отговор от В клетки е все още в ранен етап на изследване, което е причина за слабото познаване на диференциацията, активирането и функционирането им като регулаторни В клетки. Особен интерес предизвикват мненията на водещи изследователи по отношение на целесъобразността на отделянето на регулаторните В лимфоцити в специфична/и субпопулация/и с регулаторна функция, като се подчертава схващането, че най-вероятно става въпрос за широко разпространен механизъм на отрицателна обратна връзка на основата на експресия на IL-10 от разнообразни В клетки след активация и/или терминална диференциация. В тази връзка, изследването на слабо проучения регулаторен потенциал на незрелите транзитивни В лимфоцити в слезката (T1 и T2 В клетките), както и на стимулирани през BCR В-1 лимфоцити, определя актуалността и значимостта на дисертационния труд.

## **Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд обхваща 106 страници и е илюстриран с 24 фигури и 2 таблици. Цитирани са 233 литературни източника, като повече от половината са от последните 10 години. Трудът е разпределен в 10 раздела: Използвани съкращения – 1 стр.; Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 34 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 6 стр.; Резултати – 30 стр.; Обсъждане на резултатите – 10 стр.; Изводи – 1 стр.; Научна дейност – 2 стр.; Библиография – 14 стр.

По-важните моменти от литературния обзор, свързани с обща характеристика на В-лимфоцитите, фенотипна и функционална характеристика на В-лимфоцитните субпопулации, антиген-представяща функция и регулаторна функция на В-лимфоцитите и използването на В-лимфоцитите в имунотерапията, са илюстрирани с 2 фигури и 2 таблици. Получените резултати са онагледени с 22 фигури. Авторефератът е изготвен според изискванията, като в него са представени резултатите от собствените изследвания, изводите и приносите на дисертационния труд.

## **Анализ на дисертационния труд**

*Въведението* насочва към актуалността и значимостта на проблематиката, представя потенциала на В лимфоцитите чрез антигенно представяне и чрез секретирани от тях цитокини и имуноглобулини да контролират имунния отговор. В допълнение, в него се акцентира на пластичността на В лимфоцитите да стимулират или потискат Т клетките, която се определя от наличието на отделни В клетъчни популации, които, заедно с разтворими и мембранно-свързани фактори, влияят на имунния отговор и на изхода от него.

*Литературният обзор* представя литературни данни по основната тема на дисертационната работа, обособени в 5 глави: (1) Обща характеристика на В лимфоцитите; (2) Характеристика на В-лимфоцитните субпопулации; (3) Антиген-представяща функция на В лимфоцитите; (4) Регулаторна функция на В лимфоцитите; (5) В лимфоцитите в имунотерапевтичните подходи. В глава 1 са разгледани произхода и диференциацията на чернодробните и костно-мозъчните В лимфоцити (съответно, В-1 и В-2 лимфоцити). Особено внимание е отделено на основните стадии в развитието на В клетките в слезката през транзитивните Т1 и Т2 В клетки и на сигналите от средата, отговорни за преживяемостта им и тяхната диференциация в зрели МZ- и FO лимфоцити. Глава 2 представя фенотипната характеристика на В лимфоцитните популации – В1 и В2 клетките (включващи транзитивните Т1 и Т2 клетки, и зрелите МZ и FO В клетки). В хронологичен ред е представен репертоара от специфичности за отделните В популации и е проследена тяхната съдба в лимфните органи. Разгледани са също така ключовите за вродения имунитет TLRs и различното им присъствие в отделните популации. В глава 3 е описан подробно механизма на антиген-представящата функция на В лимфоцитите и значението на BCR – медираното антигенно представяне, както и ролята на В клетките като ключов фактор за активиране на антиген-специфични Т клетки по време на първичен имунен отговор. Глава 4 е отделена на регулаторната функция на В клетките, като са

представени различни миши модели на автоимунни заболявания и установените досега механизми на имunosупресия от страна на отделни В клетъчни популации, свързани основно с продукцията на IL-10. Същевременно са представени и други фактори с установена роля за регулаторната функция на В клетките като TGF- $\beta$ , GM-CSF, IL-35 и IL-21, TIM-1. Внимание е отделено и на секретиранияте от В лимфоцитите имуноглобулини заедно с характеристика на ИВИг препаратите и повишения ефект на тяхната имуномодулираща протективна роля след третиране с Fe йони, реактивни кислородни радикали, буфери с високо или ниско рН и др.

В глава 5 са разгледани възможностите за използване на В лимфоцитите в имунотерапията на различни заболявания. Дискутирани са примери от изследвания, даващи обнадеждаващи резултати при прилагане на регулаторните свойства на В клетките за подтискане на имунния отговор при автоимунни заболявания. Също така са представени данни относно сравнително слабо проучената роля на В клетките в системното възпалително състояние сепсис и участието на активирани перитонеални B1-а лимфоцити в контрола на изхода от възпалението при LPS-индуциран сепсис след миграцията им до слезката и развитието им до (пре)плазмабласти, продуциращи GM-CSF - т. нар. IRA В клетки.

От отлично написания на добър научен език и стил и логично структуриран литературен обзор личи добрата осведоменост на докторантката за различните сложни аспекти на имунния отговор.

Въз основа на представените литературни данни, намирам формулираната *цел* за коректно поставена с правилно подбрани задачи за нейното изпълнение. Разделът „*Материали и методи*“ включва пълно описание на използваните материали и методи, което позволява възпроизвеждане на експериментите без ползване на допълнителна методична литература. Докторантката прилага с лекота широка гама от съвременни експериментални методи, като се аргументира за прилагането на един или друг подход за изпълнение на поставените задачи.

В раздела *Резултати* са представени експерименталните резултати и анализи, а в раздела *Обсъждане* същите се разглеждат и обсъждат в светлината на литературни данни.

Първоначалните експерименти са насочени към оптимизиране на условията за сортиране на четири основни субпопулации В клетки в слезката при мишки - фоликуларни (FO), маргинални (MZ), ранни транзитивни (T1) и късни транзитивни (T2) В лимфоцити, с цел да се изследват и сравнят антиген-представящите им свойства. С използване на подходящи повърхностни маркери (CD21, CD23 и CD93) и комбинация от две негативни и една позитивна селекции докторантката успява да изолира, раздели успешно и обогати В клетъчните субпопулации FO, MZ и T1 В лимфоцити от миши спленоцити. Поради невъзможност T2 клетките да бъдат изолирани самостоятелно, тяхното влияние върху активацията на Т клетките е проследявано индиректно чрез отчитане на ефекта от присъствието или отсъствието им в стимулаторната популация В лимфоцити. Изследването на иницираните от така сортираните В клетки първични

имунни отговори налага като следваща стъпка разработване на модел на първичен имунен отговор и като такъв се използва смесена лимфоцитна култура, която, при първа експозиция на Т клетъчния репертоар на чуждите антигени, води до лесно проследяем поликлонален отговор. Способността на наивните В-лимфоцити да стимулират Т клетки се оценява по процента на пролифериралите Т клетки, предварително оцветени с вътреклетъчното багрило CellTrace™ Violet, както и по продукцията на цитокини от пролифериралите Т клетки. При ко-култивиране на позитивно селектирани Т клетки с FO и MZ В лимфоцити се установява, че MZ В лимфоцитите индуцират по-силна пролиферация на алогенни CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити в сравнение с FO В лимфоцитите, като това тяхно свойство се обяснява с експресията на високите нива на МНС клас II и ко-стимулаторни молекули. Получените резултати са в съгласие с литературни данни, което дава основание този модел да се използва и за следващо проследяване на потенциала на транзитивните В лимфоцити да активират Т клетки. Резултатите показват, че T1 В клетките притежават по-ниска способност да индуцират Т-клетъчна пролиферация в сравнение със зрелите популации FO и MZ В лимфоцити, причина за което е по-ниска експресия на МНС клас II и ко-стимулаторни молекули. Индиректното проследяване на потенциала на T2 клетките показва, че тяхното присъствие в стимулаторната популация потиска пролиферацията на Т клетките. Понеже диференциацията на стимулираните Т лимфоцити в една от няколко алтернативни субпопулации CD4<sup>+</sup> Т клетки се определя и от цитокиновия профил на средата, докторантката сменя профил на два от множеството цитокини, които се секретират от активираните Т клетки - IFN $\gamma$  и IL-10. Първият е характерен за Th1 отговора, докато вторият е обсъждан както като Th2 цитокин, така и като регулаторен/супресивен цитокин. След седемдневно стимулиране с алогенни FO и MZ В лимфоцити на CD4<sup>+</sup> Т клетки последните продуцират основно IFN $\gamma$ , и обратно, алогенните T1 В клетки индуцират продукция на IL-10 и значително по-нисък процент IFN $\gamma$  от активираните Т клетки. Тези резултати демонстрират потенциал на транзитивните и зрелите В клетки за противоположно насочване на диференциацията на Т клетките. В първоначално използвания модел на смесена лимфоцитна култура респондерите са Т лимфоцити от BALB/с мишки, докато стимулаторните В лимфоцитни популации са изолирани от 2 аутбредни мишки ICR. Опитите за проследяване на стимулиращия потенциал на отделните В клетъчни субпопулации и скринирането за двата типа цитокини са повторени, като за стимулатори са използвани разглежданите В клетъчни популации, сортирани с помощта на клетъчен сортер от спленоцити на C57BL/6 мишки. Данните се потвърждават, с изключение на самостоятелно сортираната T2 клетъчна популация, която предизвиква значително Т-клетъчно активиране. MZ В лимфоцити индуцират по-силна продукция на IFN $\gamma$  в сравнение с FO В лимфоцити, потвърждавайки по-рано установеното им свойство да стимулират диференциацията предимно към Th1 фенотип. Същевременно, MZ В клетките стимулират и висока продукция на IL-10, което означава, че могат ефективно да стимулират и диференциацията към Th2/Tr1. Между T1 и T2 клетките също се наблюдават функционални различия - T1 В клетките показват потенциал да стимулират

продукция на IL-10 от Т клетките, което е характеристика на регулаторните Т клетки. По отношение на Т2 В клетките се наблюдава силно стимулиращ ефект върху пролиферацията на Т-клетки наред с повишена секреция на IFN $\gamma$ , в противовес на установената индиректно потискаща роля на Т-клетъчната пролиферация.

Към този раздел имам следните забележки:

1/ Възможно е наблюдаваните противоречия в резултатите по отношение стимулиращия ефект на Т2 В клетките да се дължат на начина, по който той е установяван - в първия случай този ефект се проследява индиректно, поради невъзможност Т2 клетките да бъдат сепарирани с магнитни частици, докато в другия случай те са отделени в относително чиста фракция. Освен това, ефектът на Т2 лимфоцитите върху секрецията на IL-10 и IFN $\gamma$  от активираните с тях Т клетки е изследван единствено при използването на C57BL/6 мишки, т.е. няма база за сравнение с ефекта на Т2 върху Т клетки от BALB/c мишки.

2/ Сравняването на резултатите за противоречивия стимулиращ и потискащ ефект върху Т-клетките от транзитивните Т2 клетки, получени в настоящето изследване, със супресивния ефект на Т2-MZP клетки, установен от Evans et al. (2007), е неприемливо, поради факта, че авторите установяват такъв ефект вследствие на продуцирани високи нива на IL-10 от самите Т2-MZP клетки (причислявани към Bregs), а не следят продукцията на IL-10 от Т клетките.

Усилията по-нататък се съсредоточават върху изследване на антиген-представящите свойства на отделните В клетъчни популации в *in vitro* модел на антиген-специфичен първичен имунен отговор, което би било форма на проверка за общовалидността на наблюдаваните феномени.

Използваният в първата част на изследванията модел с използване на алогенна стимулация не възпроизвежда точно първичния имунен отговор. Основната разлика е именно по отношение на В клетките, които представят сурогатни Т клетъчни антигени, без това да е предшествано от антигенно разпознаване, свързване от В клетъчния рецептор и активация на В клетката, което е съществен етап от антигенното разпознаване *in vivo*. Експерименталната постановка за сравнение на стимулаторния потенциал на В-лимфоцитните популации налага конкретен антиген да бъде представен от значителна част от всяка една от субпопулациите. Съществуват хаптени, които се разпознават кръстосано от голям процент от В клетките, като особено широк спектър от В клетъчни рецептори разпознават като хаптен FITC. FITC-конюгирани антигени в комбинация с трансгенни CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, специфични за конюгирания антиген, се оказват интересен модел за Т-В клетъчни взаимодействия. В такъв антиген-специфичен модел на първичен имунен отговор именно е изследвана способността на различни В-клетъчни субпопулации да свързват с антигенните си рецептори антигена OVA-FITC, да го представят на CD4<sup>+</sup> Т клетки и да повлияват по-нататъшната им диференциация. В-клетъчната специфичност е проверена спрямо свързване на няколко моделни антигена под различна форма (FITC-конюгирани или биотинилирани) и резултатите показват, че свързване на антиген се наблюдава само при В клетките, инкубирани с OVA-FITC.

Приблизително 20% от общите В лимфоцити от слезка свързват OVA-FITC, като при MZ и T2 В лимфоцитите се наблюдава относително по-висок процент на свързване в сравнение с това на FO и T1 В лимфоцитите. В допълнение, приблизително 60% от полиспецифичните перитонеални В-1 лимфоцити свързват антигена.

За да се провери дали В клетките, които свързват антигена OVA-FITC, го интернализират и представят ефективно, е проследено как общи В лимфоцити стимулират трансгенни OVA-специфични CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити в модел на антиген-специфичен първичен имуен отговор. Изследванията показват, че седемдневно ко-култивиране на цяла популация C57BL/6 В лимфоцити със CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, специфични за OVA<sup>323-339</sup>, в присъствие на OVA-FITC предизвиква силно стимулиране на Т клетките, като процентът на пролифериращите клетки нараства с увеличаване на концентрацията на антигена в средата. Едновременно с това нараства и процентът на IL-10 – продуциращите Т клетки. Установяват се и различия в способността на отделните В клетъчни популации да активират антиген-специфичните Т клетки след ко-култивиране на FACS-сортирани T1, T2, MZ и FO В лимфоцити от C57BL/6 мишки с OVA<sup>323-339</sup>-специфични CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити от трансгенни OTH мишки в присъствие на OVA-FITC. T1 и MZ В клетките са с по-слаб стимулиращ ефект, съпроводен с висока честота на IL-10<sup>+</sup> Т клетки, за разлика от FO и T2 В клетките, които индуцират по-силна пролиферация, но по-ниска честота на IL-10<sup>+</sup> Т клетки. Същевременно липса значима продукция на IFN $\gamma$  от активираните Т клетки. Във връзка с известните от литературата данни за секреция на IL-10 от страна на активирани MZ В клетки, който е фактор, стимулиращ диференциация на т. нар. индуцируеми Трег клетки (Tr1), също продуциращи IL-10, се изказва интересното предположение, че натоварването на MZ В клетките с OVA-FITC им придава регулаторни свойства, благодарение на които могат да оказват влияние върху диференциацията на Т клетките към Tr1 фенотип. Също така е възможно и при T1 В клетките подобният, макар и по-слаб, ефект, който оказват върху диференциацията на Т лимфоцитите, да се дължи освен на способността им да ограничават Т-клетъчната пролиферация, също и на такова слабо активиране при свързването на антигена.

Следващ етап от работата на докторантката е изследване на регулаторния потенциал на полиспецифичните В-1 клетки при експериментален миши сепсис. В предишни изследвания е установено, че препарати от ИГГ за венозно приложение, модифицирани с протеин-дестабилизиращи агенти като ниско рН, железни йони, третиране с хем, с кислородни радикали и т.н., показват изненадващ терапевтичен ефект в модел на ендотоксинов сепсис. След наблюдаваната предимно IL-10 секреция от Т клетки, стимулирани с В клетки с характерна полиспецифичност, и в контекста на хипотетичната противо-сепсисна функция на полиспецифичните В-1а преплазмабласти, докторантката решава да потърси връзка между способността на модифицирани ИВИГ препарати (мИВИГ) да контролират LPS-индуциран сепсис при мишки и участието на В-1 лимфоцитите в този процес при провеждане на опити *in vitro* и *in vivo*. Резултатите от *in vitro* експериментите дават сериозно основание да се предположи, че съществува

синергизъм между мИВИг препаратите и ендотоксина в стимулиране на диференциация на перитонеалните В-1а клетки до IRA В клетки. При опитите *in vivo*, чрез прицелно потискане на пролиферацията и диференциацията на В-1 клетките с помощта на вътреклетъчно багрило, инжектирано интраперитонеално, докторантката убедително доказва участието на перитонеалните В-1 клетки в контрола на възпалението при сепсис и проявата на протективен ефект от страна на мИВИг препарата.

**Изводи и приноси** Приемам направените изводи и представените приноси, като смятам, че те напълно отразяват и сумират резултатите от настоящето изследване.

**Наукометрични показатели** Резултатите от проведените изследвания са представени в две научни публикации в списания с ИФ, *Autoimmunity Reviews* (IF=7.095) и *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* (IF=0284), като във втората публикация Шина Пашова е първи автор. Част от резултатите са докладвани на 5 международни и национални научни форума под формата на 4 постера и 1 кратка презентация.

**Въпроси** Бих искала да задам следните въпроси на докторантката:

1/ Кое Ви дава основание в схемата за разнопосочните ефекти на отделните В-клетъчни популации върху имунния отговор (Фиг. 20) да подчертаете толерогенния ефект на T2 В клетките, след като изследванията с чиста популация T2 клетки показват силно стимулиращ ефект върху пролиферацията на Т клетки, както и относително висока секреция на IFN $\gamma$ , равностойна с тази на IL-10?

2/ Какви терапевтични стратегии, целящи стимулиране на регулаторен Т-клетъчен отговор, бихте предложили с използване на MZ В клетките в случаите, в които представят FITC-конюгирани антигени?

### **Заключение**

Представените резултати несъмнено представляват принос за изясняване ролята на отделните В клетъчни популации върху имунния отговор и изхода от него. Те са и отлична основа за по-нататъшни изследвания за приложение на характеризираните отделни В-клетъчни популации в разработване на имунотерапевтични стратегии. Със своя дисертационен труд Шина Пашова се представя като много добре подготвен в методично отношение и със солидни познания в молекулярната имунология изследовател, способна критично да анализира резултатите от своите научни изследвания. Считаю, че представеният ми за рецензиране труд притежава всички необходими качества и отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника за неговото приложение. **Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на почитаемото жури да присъди на Шина Иванова Пашова образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност Имунология.**

София, 17.11.2015 г.

Рецензент:

/Проф. д-р Магдалена Чорбаджиева/