

## СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р **Николина Михайлова Михайлова**, Лаборатория по имунохистохимия и имунопатология, Департамент Имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, Българска Академия на Науките

избрана за член на Научното жури със Заповед № I- 15/23.01.2025 г. от Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика** професионално направление **4.3. Биологически науки** научна специалност „Имунология“

**Автор:** Никола Ралчев Ралчев

**Тема:** *Потискане на антиген-специфични В лимфоцити чрез протеинови инженерни молекули при реакции на свръхчувствителност*

**Научен ръководител:** проф. д-р Андрей Чорбанов

### 1. Общо описание на представените материали

Автор на дисертационния труд е Никола Ралчев Ралчев – докторант в редовна форма на обучение към Департамент „Имунология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, с научен ръководител проф. д-р Андрей Чорбанов.

Представеният за разглеждане комплект материали на хартиен носител и в електронен вариант, е в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на БАН за прилагане на ЗРАСРБ и отговаря на критериите на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

Докторантът е приложил 2 броя публикации по темата на дисертацията и съответния доказателствен материал, както и сертификати от участия в научни конференции. *Общата му научна продукция е 15 публикации в международни списания, цитирани 58 пъти; h-индексът на докторанта е 3, по данни на Scopus.*

### 2. Актуалност на тематиката

Темата на дисертацията е изключително актуална поради нарастващата честота на алергичните заболявания както в световен мащаб, така и в България. Алергиите засягат все по-голяма част от населението, особено в индустриализираните страни, което се свързва със замърсяването, промените в начина на живот и хигиенната хипотеза.

По данни на Световната здравна организация, между 30-40% от населението глобално страда от алергии, като през последните две десетилетия честотата на тези състояния се е удвоила.

В България, данни от епидемиологично проучване показват, че разпространението на бронхиалната астма е 4.7% при лицата на възраст между 20 и 44 години и 9.1% при тези под 20 години. Средната честота на алергичния ринит в същото проучване е 18.1%. При децата ситуацията е особено тревожна. Алергичните заболявания засягат между 30% и 35% от децата, като честотата им продължава да нараства през последните години. Тези статистически данни подчертават необходимостта от засилени мерки за превенция, ранна диагностика и ефективно лечение на алергичните заболявания в България.

Все повече изследвания показват връзката между алергиите и автоимунни заболявания, астма, екзема и други възпалителни състояния. Научният напредък разкрива все повече данни за наследствените и епигенетичните фактори, които определят предразположеността към алергии. Промените в климата водещи до удължаване на периода на цъфтеж на растенията и повишената концентрацията на полени, влияят върху развитието на сезонните алергии.

Разработването на нови методи за диагностика (молекулярна алергодиагностика) и иновативни терапии като биологичните лекарства, имунотерапията и моноклоналните антитела е от изключително значение както от научна, така и от гледна точка на общественото здраве и настоящата разработка е много актуално и важно усилие в търсенето на иновативни терапевтични подходи.

### **3. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационният труд има структура според изискванията на Правилника за прилагане на закона за развитие на академичния състав на ИМикБ - БАН, а именно съдържа 105 стр., 29 фигури и библиографична справка, включваща 211 литературни източника. Структуриран е както следва:

- ✓ Заглавие
- ✓ Съдържание
- ✓ Използвани съкращения
- ✓ Увод – 1 страница; Представящ синтезирано основния проблем на дисертационния труд.
- ✓ Литературен обзор – представен на 29 страници включващи 9 илюстративни фигури и 2 таблици. Литературният обзор показва задълбочените познания на докторант Никола Ралчев върху съвременните изследвания по темата на дисертацията. Много елегантно и плавно, дисертантът въвежда читателя в сложната тематика на реакциите на свръхчувствителност като прави преход от етиологията им към механизмите на развитие и протичане на алергичните реакции. В отделен подраздел е обърнато внимание на алергията към домашен прах, която е главния герой в настоящия дисертационен труд, като систематизирано е поднесена комплексна информация за механизмите на въздействие на причинителите на алергията към домашен прах, а именно микрокърлежите от вида *Dermatophagoides pteronyssinus*. Направен е задълбочен анализ на биологичната активност и функционалната характеристика на основните НДМ алергени, като са представени основните механизми на действие на алергените и по-конкретно активиране на TLR, лектиновите рецептори от С-тип, както и NOD-подобните рецептори. Използваните фигури и таблици в литературния обзор, внасят допълнителна яснота в представената информация. Разгледани са съвременните подходи за терапевтично повлияване на

алергиите, като са отчетени както положителните страни на съответните терапии, така и негативните такива. Обърнато е внимание и на изключително важните експериментални модели които се използват, както за изясняване на механизмите на алергичните заболявания, така и в търсенето на нови терапевтични подходи. Отчита се нуждата от търсене на иновативни и специфични терапии, което прави настоящата работа от изключително значение за разкриване на нови възможности за лечение. Наличието на отделен подраздел представящ предишните проучвания на научния колектив в тази област, показва системност и постоянство в работа по представената тематика.

✓ Цели и задачи – Целта е точно и ясно дефинирана, като за постигането ѝ са изведени четири добре формулирани и логически-свързани задачи:

1. Конструирание и охарактеризиране на миша Dp52-71 химера.

2. Разработване на експериментални модели на алергия към домашен прах:

2.1. Хуманизиран Rag2-  $\gamma$ c- модел.

2.2. Миши BALB/c модел на хронично алергично възпаление.

3. Прилагане на химерни молекули при експерименталните модели на алергия и изследване на ефекта им върху нивата на алерген-специфичните антитела.

4. Изследване на терапевтичния ефект на химерите върху увреждането в белия дроб и характеристиките на имунния отговор, медиран от алергичното възпаление при двата експериментални модела.

✓ Материали и методи – Методологията използвана при разработването на дисертационния труд е нагледно представена на 15 страници и 2 фигури и отразява разнообразен набор от молекулярно-биологични, имунологични и хистологични методи, които са добре описани и дават възможност за възпроизводимост. За разрешаване на поставения научен казус, докторантът и неговия ръководител са използвали два съвременни и много сложни методологични подхода – хуманизиран миши модел и хроничен миши модел на алергия към домашен прах. Това са изключително предизвикателни за изпълнение модели, криещи множество неизвестни. Методологията е разделена и описана по вид на експерименталния модел, което улеснява проследяването на експерименталния подход. Използваните методи дават възможност да се охарактеризира както клетъчния, така и хуморалния имунен отговор спрямо изследвания терапевтичен подход, което прави възможно изясняването на конкретни механизми на въздействие. Без съмнение, настоящия раздел потвърждава, че дисертационният труд представлява сериозно и задълбочено изследване, на високо методологично ниво.

✓ Резултати – Представените резултати за разделени в два основни подраздела и отразяват заложените задачи. Извършена е огромна по обем работа което се доказва чрез 16 комплекси фигури с много добро качество. В разделът описваш ефекта от специфичната терапия в хуманизиран модел на алергия, са представени резултати от локалния и системния именован отговор и смятам, че е извлечена максимална информация от този ограничен в своето проявление експериментален модел, тъй като при него се въвеждат краен брой човешки клетки в мишия организъм. Въпреки ограниченията на модела, Никола отчита понижаване на нивата на специфични IgE антитела и повлияване на общия протеин и  $\beta$ -хексозаминидазата в бронхоалвеоларна течност на третираните групи

животни. Анализирани са и инфилтрираните в мишите бели дробове човешки лимфоцити, като е отчетена тенденция за намаляването им при терапевтичната група в сравнение с контролната. Описано е и повлияване на общото възпаление на белите дробове при третираните с Dp52-71 химера животни в сравнение с контролната химера.

Втория по-голям раздел от резултатите описва конюгирането и охарактеризирането на конструираните химерни молекули. Представени са резултати доказващи наличието на всеки компонент влизащ в състава на химерите, както и специфичността на конструктите. Резултатите от ефекта на химерните молекули върху разработения хроничен модел на алергия към домашен прах, доказват и ефективността на самия модел. Това само по себе си е резултат, който не може да бъде пренебрегнат, имайки в предвид трудностите при разработване на такива експериментални модели. В този случай, докторанта има възможност да изследва в много по-голяма пълнота ефектите на специфичната терапия, което включва хуморален и клетъчен отговор както на локално, така и на системно ниво. Впечатление прави, корелационния анализ на проявите на заболяването при разработения мишия модел и опита на докторанта да го обвърже с резултатите получени при терапевтичните животни. Получени са нови данни за повишаване на експресията на инхибиращия FcγRIIb рецептор по повърхността на IgE позитивните В клетки.

- ✓ Дискусия – състояща се от 10 страници, синтезирана и обобщена информация от получените резултати в дисертационния труд. Дискусията е задълбочена и отразява критичен анализ на получените резултати спрямо данни от други научни източници. Никола, без притеснение, дискутира ограниченията на приложения от него експериментален подход, като аргументирано дава възможни варианти за разрешаването им. Получените нови данни за свръхекспресията на FcγRIIb и корелацията на серумните нива на анти-HDM IgG1 антителата с някои параметри на алергичното възпаление, дават нови възможности за бъдещи разработки с цел изясняване на конкретните механизми за контрол в контекста на алергичните заболявания.
- ✓ Изводи – 1 страница; Ясно формулирани, отразяващи основни резултати от проучването;
- ✓ Приноси - 1 страница; Докторантът и неговия ръководител извеждат Приноси с фундаментално значение и Приноси с научно-приложен характер с които съм напълно съгласна.

#### **Приноси с фундаментално значение**

- За първи път е показано, че FcγRIIb е свръхекспресиян по повърхността на В лимфоцитите, включително и на IgE-позитивните В клетки, изолирани от бял дроб на мишки, стимулирани с алергени от домашен прах.
- Установена е връзка между нивата на серумните анти-HDM IgG1 антитела с някои параметри на алергичното възпаление, която може да спомогне за изясняване ролята на IgG1 антителата в патогенезата на мишите модели на HDM алергия.

#### **Приноси с научно-приложен характер**

- Разработени са експериментални хуманизиран и хроничен миши модел на алергия към домашен прах, които могат да бъдат използвани при изследвания свързани с механизмите на заболяването, както и на нови терапевтични подходи.

- Използваната протеин-инженерна химерна технология, целяща селективното елиминиране на алерген-специфични В клетки, има потенциала да бъде използвана за разработването на нови подходи за специфична терапия.
- ✓ Публикации и участия на научни форуми – 1 страница; две публикации в индексирани и реномирани научни издания (Q1 и Q2); 9 представяния на научни форуми по темата на дисертацията – 7 доклада и 2 постера
- ✓ Използвана литература – 14 страници, 211 използвани източника

#### **4. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

По темата на дисертацията има публикувани две статии в реферирани и реномирани международни списания – Scandinavian Journal of Immunology (Q2) и International Journal of Molecular Sciences (Q1), с общ IF 8,06.

По време на дисертацията си, Никола Ралчев има множество представяния на големи международни научни форуми, като на два европейски конгреса по имунология, той се е представил с доклад. Смятам, че това само по себе си е показателно за качествата на представената разработка, а фактът, че Никола, като докторант е бил одобрен за устна презентация е нещо с което малко хора биха могли да се похвалят и е показателно за важността и актуалността на тематиката.

**Лично участие на докторанта** – Доказателство за личното участие на докторанта са двете статии по темата на дисертацията, в които Никола Ралчев е първи автор. Аз имам и лично впечатление от работата на Никола през годините. През целия период на дисертацията, той показваше всеотдайност, инициативност и желание да реши възникналите в хода на работата проблеми, а те не бяха никак малко. Смятам, че този период и всички трудности изградиха Никола Ралчев като перспективен млад учен, които е способен да се справи с всички научни предизвикателства пред които се изправи. Това ми дава основание да приема безспорно личния принос на докторанта в извършените изследвания.

#### **5. Критични забележки, препоръки и въпроси**

Нямам критични забележки към проведените изследвания.

#### **6. Автореферат**

Авторефератът към дисертационния труд на Никола Ралчев отразява основните постигнати резултати и отговаря на всички общоприети изисквания в Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България (ППЗРАСРБ).

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените дисертационни

резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИМикБ - БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че Никола Ралчев **притежава** задълбочени теоретични знания и практически умения като **демонстрира** качества и способности за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Въз основа на изложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, и **предлагам на уважаемото жури да присъди на Никола Ралчев Ралчев образователната и научна степен „Доктор“ в направление 4.3. Биологически науки.**

24.02.2025г.

Рецензент: .....

(доц. д-р Николина Михайлова)