

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'Доктор'

от доц. Петя Асенова Димитрова, Лаборатория по експериментална имунотерапия,
Департамент по имунология, Институт по микробиология "Стефан Ангелов"

избрана за член на Научното жури със Заповед № I-15/23.01.2025г. г. от Директора на
Институт по микробиология, БАН и за рецензент от Научното Жури с Протокол №1/
30.01.2024г.

Дисертационен труд с автор: Никола Ралчев Ралчев, докторант в редовна форма на обучение към Лаборатория по експериментална имунология на Департамент „Имунология“, Институт по микробиология

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

Научен ръководител: проф. д-р Андрей Чорбанов

Направление: 4.3. Биологически науки (Имунология)

1. Общо описание на представените материали

Авторът на дисертационния труд Никола Ралчев е докторант в редовна форма на обучение към Лаборатория по експериментална имунология на Департамент „Имунология“, Институт по микробиология, БАН, с научен ръководител проф. Андрей Чорбанов. Никола Ралчев е представил на хартиен носител и в електронен вариант, съответните документи, според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ-БАН, а именно: заявление за допускане до защита, копие от завършена магистърска степен (специалност Клетъчна биология и Биотехнология, Биологически факултет, Софийски университет), заповед за зачисляване (I-91/31.07.2020), заповед за удължение от една година (I-91/31.07.2023), заповед за отчисляване с право на защита, считано от 31.07.2024г. (I-105/30.07.2024), протоколи от изпити (английски (Протокол 63/12.02.2021), първи (Протокол 28.01.2021) и втори (Протокол 20.06.2022) минимум по специалността) и курсове по специалността (компютърен курс Photoshop (23.04.2021), курс „Увод в клетъчното и тъканно инженерство“, курс „Теоретични и практически основи на класическите и съвременни хистологични методи“), справка за получените кредитите според изисквания на ИМикБ-БАН (общо 502 кредита от минимални 250 кредита), протокол от предзащита (№2/20.01.2025) и предварителна рецензия на дисертационен труд, дисертационен труд и автореферат на български, списък на публикациите (2 статии в Scandinavian Journal of Immunology (Q2) и International Journal of Biological Sciences (Q1)), декларация за оригиналност и автобиография.

2. Актуалност на тематиката

Алергичните реакции, са реакции на свръхчувствителност от бърз I-ви тип към антигени, наречени алергени. Като всички останали реакции на свръхчувствителност, те могат локално да увредят тъкани и системно да предизвикат анафилаксия с анафилактичен шок в рамките на 4-8 часа. Силата на алергичните реакции зависи от природата, дозата и пътя на проникване на алергена. Алергените са малки стабилни протеини или гликопротеини, повечето от които са

водоразтворими и с протеазна активност, за да могат да проникнат през епителните бариери и кожата. Алергените, които проникват в организма през кожата или мукозния епител на респираторния тракт и очите се наричат аероалергени, а тези които проникват през гастроинтестинален тракт – хранителни алергени. Аероалергените се срещат в затворени помещения – алергени от домашен прах (HDM) – частици, свързани с фекални остатъци от акари, хлебарки, плесени, козина и пърхут на домашни любимци и разпространени на открито (алергени от плесени, полени и други частици), част от particular matters при замърсяване на въздуха и водата. Поради непрекъснатата среща с алергени, честите алергичните реакции водят до системно нарушаване на имунния отговор и алергични заболявания, като алергичен ринит (AR), алергична астма (AAS), атопичен дерматит (AD), хранителна алергия (FA) и екзема.

Разпространението на алергичните заболявания се е увеличило значително през последните години, като в момента засяга приблизително 10–30% от световното население. То е по-високо в развитите страни, отколкото в развиващите се страни. Все по-често алергичните заболявания засягат деца, особено в предучилищна възраст. От значение е и социално-икономическата тежест на алергиите, свързана с често обостряне на симптомите и непрекъснати разходи за лечение. Например оценката на годишните разходи за атопичен дерматит в САЩ е приблизително 5,297 милиарда щатски долара, за алергичен ринит – над 2 милиарда. Един от наболелите проблеми с алергичните заболявания е свързан с все по-честата поява на т.нар. атопичен марш – това е феномен, при който около една трета от пациентите – юноши и възрастни с атопичен дерматит развиват и други алергични състояния, като астма. Алергичните заболявания са хетерогенни, със сложна патология, зависят от много фактори, включително средата по време на ембрионалното развитие (майчино-фетална среда), генетични и епигенетични фактори и имунен статус на организма. Климатичните промени, също представляват рисков фактор, свързан с повишен риск от развитие на алергични реакции – например промяната на температурата, дава възможност за развитие на плесени или за повече частици във въздуха, които се разнасят на големи разстояние при силни ветрове и урагани и усилват честотата на алергичните реакции, особено при генетично предразположени индивиди.

Алергичните реакции започват с имунен отговор към алергена, при който се активират каскадата на вродения имунитет при епителни клетки и локално разположените дендритни клетки, представящи антигена на наивни хелпърни CD4+ Т лимфоцити. Последните могат да се поляризират до фоликуларни Т клетки и подпомагат диференциацията на В клетките към плазмоцити и към изотипно превключване към продукция и секреция на имуноглобулини от клас IgE. Решението на В клетките да продуцират IgE се затвърждава и от друга популация от хелпърни клетки, които се поляризира в Th2 посока. Процесът е под контрола на цитокини, като IL-3, IL-4, IL-5 и IL-13. Синтезираният IgE се свързва с високоафинитетни рецептори, експресирани плътно върху мастоцити в тъканите, и базофили, циркулиращи в кръвта. При повторно навлизане на алергена, повърхностно свързаните IgE го разпознават, омрежават и активират мастоцитите и базофилите към дегранулация и освобождаване на медиатори на възпалението. Секретират се хистамин, простагландини, левкотриени, които повишават съдовата пропускливост и свиват гладката мускулатура. Секретиранияте хемокини и цитокини индуцират последващи възпалителни реакции (късни възпалителни реакция) с привличане на еозинофили, неутрофили, макрофаги и допълнително насърчаване на Th17 имунен отговор, което води до повторна поява на симптоми. Тази сложна динамика на имунния отговор показва, че лечението на алергичните заболявания трябва да включва комбиниране на различни подходи или насочване към клетки, които имат отношение към началните етапи на алергичната реакция – например могат да се таргетират механизми, които регулират началната продукция на IgE от В лимфоцитите, вместо ефекторната

фаза на дегрануляция на мастоцити и базофили. Съответно този подход е залегнал в настоящата дисертация, а именно да се потиснат алерген-специфични В лимфоцити, като източник на IgE антитела, за да се преодолее хроничното възпаление, предизвикано от повтарящо се излагане на алергия към домашен прах.

3. Целесъобразност на поставените цели и задачи

В дисертацията на Никола Ралчев е поставена една цел – да се приложи селективно инхибиране на продукцията на алерген-специфични антитела към домашен прах чрез химерни молекули, съдържащи моноклонално антитяло срещу инхибиращ рецептор (човешки CR1 или миши FcγRIIb), конюгирано с епитоп-носител пептид p52-71 от акар *Dermatophagoides pteronyssinus*. Формулирани са съответно четири задачи, а именно конструиране и охарактеризиране на миша Dp52-71 химера, въвеждане на експериментални модели на алергия към домашен прах и прилагане на химерните молекули при съответните експериментални модели и изследване на терапевтичния им потенциал.

В дисертацията са предвидени 2 експериментални модела – 1) хуманизиран модел, където се извършва трансфер на човешки РВМС от алергични пациенти в реципиентни Rag2-γс- мишки - модел на индуциране на алергичен имунен отговор и 2) миши модел на последователно и многократно третиране с препарат от домашен прах за индуциране на хронично алергично възпаление към домашен прах при BALB/с мишки.

Експерименталните модели на алергии са едни от сложните модели, поради хетерогенността на алергичния отговор на клетъчно и молекулярно ниво и зависимост от специфичната природа на алергена. Затова трябва да се отбележи, че въвеждането им е особено трудно и показва, че докторантът е трябвало да се справи с високо рискови експериментални задачи.

4. Познаване на проблема

Никола Ралчев демонстрира отлично познаване на изследванията на други колективи в областта, като литературният обзор е написан компетентно и стегнато. Приложени са 9 фигури, които онагледяват механизмите, свързани с първоначална среща с алергена, ранни и късни алергични реакции, като се демонстрират взаимоотношенията на клетъчно и молекулярно ниво. Има фигури, които онагледяват и хипотезата за новия подход на терапия с хибридни молекули. В обзора има две информативни таблици, едната с описание на генетичните локуси, асоциирани с алергичните заболявания и възможни механизми на въздействие и втората за видове алергени от домашен прах. От обзора личи, че Никола Ралчев отлично познава различните терапевтични подходи – конвенционални и нови за лечение на алергични заболявания, като прави особено добро впечатление описанието на хипотезата, която е довела до формулиране на целите и задачите на дисертацията. В обзора са цитирани 4 публикации от 2024, 20 публикации от 2023 г. 4 и 51 публикации в периода 2020-2022 г., това са 36% от общите цитирани статии. Повечето от цитатите - над 80% са от последните 4-ри години и са свързани с нови хипотези, относно развитието на алергиите и нови терапевтични подходи, което показва че докторантът е следял новостите в областта и е изградил добра основа при планиране на експериментите в последствие.

5. Методика на изследването

Никола Ралчев използва разнообразна методология. Методите са разделени на 2 подточки, такива използвани при експериментален модел на трансфер на клетки от алергични пациенти в Rag2-γс- мишки и такива, свързани с експерименталната работа върху индуциране на алергия към

домашен прах при BALB/c мишки. Описани са прецизно използваните експериментални животни и има схеми на третиране при двата експериментални модела, които дават много точна представа за начина на индуциране на алергичен отговор и възпаление. При хуманизирания модел има данни за начина на подбор на алергичните пациенти и съответно трансфера на клетките в мишки. Изследвана е продукцията на анти-Dpt IgE, IgA, IgG и общи IgE антитела в течност след белодробен лаваж, описани са методи за фенотипизиране на клетките в белодробен лаваж, техниките за определяне на ензимна активност на мастоцити в лаважа – индиректен маркер за активиране на мастоцити в бял дроб, и са оценени патологичните промени в белия дроб. За охарактеризиране на алергичния отговор във втория модел са използвани методи за количествено определяне на анти-HDM IgG, IgG1, IgM и IgA в серум и BALF, анализ на общите IgE антитела и секретирани цитокини IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, фенотипизиране на клетки в белодробен лаваж и оценка на патологични промени в бял дроб. В допълнение в тази част на дисертацията е извършено конструиране на протеин-инженерни химерни молекули срещу инхибиращ CD32, експресиран върху миши клетки, като са описани методите за конструиране на химерата чрез конюгация и техники, чрез които се доказва свързването на химерата с CD32 и разпознаване на химерата от IgG1 антитела в серум.

Извършен е корелационен анализ между отделните параметри – фенотип на клетките и цитокини и фактори с цел установяване на зависимости при въвеждане на модела и оценка на вероятните ефекти след третиране с химерните молекули. Статистическите методи, са адекватни и гарантират повторимост на получените данни, използвани са и допълнителни методи за колелационен анализ.

Определено при експерименталната работа, Никола е придобил доста практически умения, които биха му дали предимство в бъдещото му кариерно развитие и отлична подготовка за планиране на нови експериментални задачи при реализиране на научни проекти.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационния труд има структура според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ, БАН, а именно съдържа следните глави:

- Заглавие
- Използвани съкращения
- Увод
- Литературен обзор - 40 страници, с подраздели за теоретичен преглед на алергични реакции, с механизми, конкретно патология при алегии към домашен прах, терапевтни подходи със споменаване и на алеген-специфична терапия, обосновка на нуждата от нови терапии и хипотеза.
- Цели и задачи – 1 страници, с поставени 4 задачи
- Материали и методи – разделени са на 2 подточки и описание на набора от техники, описани на 14 страници и онагледени с 2 фигури, демонстриращи схемата на третиране на животните
- Резултати – 28 страници, 17 фигури с повече от 6 панела.
- Дискусия – 9 страници, разделена на две, според резултатите получени от хуманизирания модел и на мишия модел
- Изводи – 1 страница
- Приноси – 1 страница –разделени на приноси с фундаментален и научно-приложен характер
- Литературни източници – 211 източника.

7. Приноси и значимост на резултатите

Според мен приносите на дисертацията са:

- Приноси с фундаментално значение
1. За първи път е показано, че FcγRIIb е свърхекспресиран по повърхността на всички В лимфоцити, включително от IgE-позитивните В клетки, изолирани от бял дроб на мишки, инжектирани с алергени от домашен прах.
 2. За първи път е използван модел на хронично алергично възпаление при мишки след инжектиране на домашен прах, при което се установява повишено ниво на серумните анти-HDM IgG1 антитела. При последващо използване на модела, количественото им определяне може да служи за маркер, показващ развитие на алерген-специфичен отговор при експерименталния модел.
- Приноси с научно-приложен характер
3. Разработени са експериментални модели на алергичен отговор и възпаление, които могат да се използват за изследване на механизмите на заболяването, както и изследване на proof-of-principles хипотези за нови терапевтични подходи.
 4. Изполваната протеин-инженерна химера, целяща селективното елиминиране на алерген-специфични В клетки, показва и ефект върху върху късните имунни отговори, медирани от еозинофили и може да насочи приложението и при заболявания, свързани с активиране на еозинофили – например паразитни или респираторни вирусни инфекции.

Особено приятно впечатление прави дискусията, свързана с резултатите от мишия модел, където личи, че Никола е придобил умения за критичен поглед върху експерименталните данни.

7. Публикации

Докторантът има 2 публикации и изпълнява изискуемите кредити и изисквания на Института по микробиология. Никола Ралчев има статия в *Scandinavian Journal of Immunology* 2022: Targeted suppression of Dpt-specific B cells in humanized Rag2- γс- mouse model of HDM allergy и Статия в *Int. J. Mol. Sci.* 2024 : Suppression of Pathological Allergen-Specific B Cells by Protein-Engineered Molecules in a Mouse Model of Chronic House Dust Mite Allergy.

В двете публикации Никола е първи автор и са по темата на дисертацията и отговарят на изискванията да в реферирани издания, като са съответно с Q2 и Q1 през 2023.

8. Критични забележки и препоръки

Моите въпроси към Никола Ралчев са:

1. Кои са предимствата и недостатъците на мишия модел на алергично хронично възпаление?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Никола Ралчев **съдържа научни, научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката** и отговарят на изискванията 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 съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИМикБ за приложение на ЗРАСРБ.

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

Поради гореизложеното, давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, и **присъждане на образователната и научна степен 'Доктор' направление 4.3. Биологически науки (Имунология) на Никола Ралчев.**

24.02.2025 г.

Рецензент:

Доц. Петя Димитрова