

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Красимира Тодорова-Хайрабедян, дбн  
Ръководител на Лаборатория по ОМИКс технологии  
ИБИР, БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'Доктор',  
с автор: *Никола Ралчев Ралчев*

на тема: *„Потискане на антиген специфични В лимфоцити чрез протеинови инженерни молекули при реакции на свръхчувствителност“*,

професионално направление 4.3. *„Биологически науки“*, научна специалност *„Имунология“*,  
с научен ръководител: *проф. Андрей Чорбанов, дб*

*Департамент по имунология, Лаборатория по експериментална имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ БАН*

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ, Правилниците на БАН и на ИМикБ за развитие на академичния състав и включва следните документи: Заявление до Директора на ИМикБ-БАН за допускане до защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат; копие от диплома за висше образование; заповеди за записване в докторантура, за удължаване на обучението; за отчисляване с право на защита; Протоколи от взет кандидатски минимум; протокол от Семинар за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури; дисертационен труд; автореферат на български и английски език; списък на научните публикации по темата на дисертацията; копия на научните публикации; списък на участията в научни форуми; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи; други документи, свързани с хода на процедурата. Документите са изрядно и йерархично подредени в електронно досие. Представената информация е подробна. Докторантът е приложил 2 публикации.

### 2. Кратки биографични данни за докторанта

Никола Ралчев Ралчев е роден на 1 ноември 1995 г. Завършва бакалавърска степен по молекулярна биология и магистърска степен по клетъчна биология и патология в Софийския университет „Св. Климент Охридски“. През годините натрупва значителен научен опит, започвайки като стажант в Лабораторията по експериментална имунология към Института по микробиология, където участва в разработването на терапия и животински модели на алергия към домашен прах. По-късно, като стажант в Cancer Research Center of Lyon във Франция, той се включва в изследвания върху неапоптоичните функции на протеини от Bcl

2 семейството, допринасяйки към разбирането на молекулярните механизми, свързани с клетъчната смърт и туморната прогресия. От 2021 г. работи като асистент в Лабораторията по експериментална имунология в БАН, където продължава своите проучвания в областта на имунотерапията. В своята научна работа Никола Ралчев прилага широк спектър от съвременни методи в областта на животинските модели, имунологията, молекулярната биология и биоинформатиката, в които демонстрира задълбочени познания. Възможността му да комбинира тези техники позволява извършването на детайлни изследвания върху имунорегулацията и молекулярните механизми на автоимунните и алергични заболявания.

Резултатите от неговата работа са публикувани в реномирани международни научни списания, като *International Journal of Molecular Sciences*, *Molecular Nutrition & Food Research* и *Marine Drugs*. Той е съавтор на над 15 научни публикации, повечето от които са с висок импакт фактор, като трудовете му са цитирани десетки пъти в международната научна литература. Освен това активно представя резултатите си на престижни научни конференции, включително *European Congress of Immunology* и *International Congress of Immunology*, като в много от тях участва с устни презентации.

Признанието за неговата научна дейност се изразява и в редица награди. През 2023 г. му е присъдена „Наградата за най-млад учен „Иван Евстратиев Гешов“ за изключителни постижения в биомедицината. Същата година получава наградата за най добра работа на млад български микробиолог от Фондация „Стефан Ангелов“. Той е носител и на отличия за представяне на научни доклади на международни и национални форуми, което допълнително подчертава значението на неговите изследвания за развитието на съвременната имунология и молекулярна биология.

Никола Ралчев участва в различни научни проекти, насочени към имунотерапевтични стратегии при автоимунни заболявания, алергии и онкологични състояния. Работи в мултидисциплинарна среда, където комбинира фундаментални и приложни изследвания за разработването на иновативни методи за модулиране на имунния отговор. Със своите знания, опит и отдаденост на науката той допринася значително за разширяването на разбирането за имунорегулацията и потенциалните терапевтични подходи при различни заболявания

### **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Разработваният в дисертационния труд проблем е изключително актуален както от научна, така и от научно-приложна гледна точка. Алергичните заболявания и особено IgE обусловените реакции продължават да бъдат сериозни медицински предизвикателства, които засягат значителен процент от населението. Тези заболявания не само влияят на качеството на живот на пациентите, но и поставят сериозни социални и икономически проблеми. Трудът се фокусира върху новаторски методи за инхибиране на алерген-специфичните В-клетки чрез химерни молекули, което предоставя ново научно направление за лечение на алергии, като преодолява ограниченията на традиционните методи. Актуалността на задачите и подходите в дисертацията се изразява в решаването на съществуващи проблеми като недостатъчна специфичност и дълготрайност на традиционните терапии, и в напредъка в

развитието на целенасочени терапевтични средства, които съчетават имунологични иновации с приложни ангажименти към пациентите.

#### 4. Познаване на проблема

Докторантът демонстрира отлична информираност за състоянието на проблема, като в дисертационния труд представя изчерпателен литературен обзор, който обхваща както теоретичните основи на свръхчувствителността и патофизиологията на алергиите, така и съвременните терапевтични подходи в областта на имунотерапията. Той творчески работи с литературния материал, свързвайки критично съществуващите научни данни с разработването на иновативен метод за селективно потискане на алерген специфичните В клетки чрез протеиново инженерни молекули, което подчертава както научната обосновааност, така и практическата приложимост на изследването. Използваната литература варира по години на издаване от началото на 2000-те до най новите публикации, като приблизително 60% от цитирания материал е публикуван през последните 5 години и покрива тематики, свързани с патофизиологията на алергиите, иновативни терапевтични стратегии, имунологични модели и протеиново инженерство.

#### 5. Методика на изследването

Методологията на изследването е изключително иновативна, като се концептуализира около разработването на химерни би-специфични химерни молекули, разпознаващи алерген по повърхността на авто-реактивни В-клетки и едновременното свързването и активирането на инхибиторни рецептори в същите тези клетки, водещо до супресия или делеция на този авто реактивен клон. Тази концепция е въведена от научния ръководител на докторанта, проф. Андрей Чорбанов и екипа му, и е вече успешно доказана да действа при ДНК специфични авто реактивни клонове В клетки. Още повече, през годините са направени редица успешни усилия да се премине от приложението на тези химерни молекули директно върху първични човешки авто реактивни клетки, към разработването на експериментални животински и хуманизирани модели, с цел пресъздаване на целия комплексен процес на авто-реактивност в човешката патология, и идентифициране на прицелни процеси за повлияването му.

В дисертационната работа са използвани два различни миши модела за изследване на алергията към домашен прах (HDM) и ефективността на химерните молекули като потенциална терапия: 1. Хуманизиран миши модел ( $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$  мишки), при който в имунодефицитни  $Rag2$   $\gamma_c$  мишки (тежък комбиниран имунодефицит, без собствени Т, В и НК-клетки), са трансферирани периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) от сенсibiliзирани (алергични) пациенти към домашен прахов акар (*Dermatophagoides pteronyssinus*, причинител на HDM-алергия). Тези мишки нямат адаптивен имунитет и са „толерантни“ към ксенотрансплантация, което позволява оцеляване и функциониране на човешките клетки в тях. Така мишките развиват подобен на този при хората имуноен отговор към алергените от домашния прах, т.к. човешките имунни клетки създават специфична човешка микросреда в имунните органи на мишия реципиент, и могат да взаимодействат помежду си. Впоследствие моделът се провокира с алергена (напр интраназално въвеждане

на екстракт от *D. Pteronyssinus*). Човешките Т- и В-клетки разпознават интраназалния алерген (чрез човешките си рецептори) и възпроизвеждат Th2 опосредстван алергичен отговор, аналогичен на този при човек, с продукцията на специфични за алергена IgE антитела и възпалителни промени в дихателните пътища. Тези IgE антитела се свързват с мишите мастоцити, т.к. FcεRI рецепторът им разпознава човешки IgE и го задържа на повърхността им. Така, повторно излагане на същия алерген *in vivo*, води до омрежването му с човешкия IgE върху мишите мастоцити и предизвиква тип I свръхчувствителност – мастоцит-медирана ефекторна фаза с дегранулация на мастоцитите и алергична реакция (бронхоконстрикция, съдова пропускливост и др.), наподобяваща астматичен пристъп при човек.

Основни предимства на Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> модела: (1) Той позволява изследване на човешки имунни реакции в жив организъм, преодолявайки ограниченията на *in vitro* експериментите. Животинските модели с човешки клетки осигуряват циркулация, триизмерна тъканна среда и мултиорганни взаимодействия, които засега са невъзможни *in vitro*. (2) Моделът Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> за алергия имитира реална алергична реакция – човешките клетки общуват помежду си (човешки антиген-представящи клетки представят антигена на човешки Т-клетки, които помагат на човешки В-клетки да превключат клас към IgE и пр.) и дават продукцията (IgE), която може да активира рецептори на приемния организъм. (3) Моделът е сравнително бърз и гъвкав – чрез преливане на сенсibiliзирани донорски клетки, мишката вече е алергична и реакциите се индуцират за дни до седмици, вместо да се чака сенсibiliзация на наивна имунна система. (4) Моделът позволява тестването на терапевтични агенти (като разглежданото анти тяло) в предклиничен план, защото позволява оценка на ефекта им върху човешки клетки *in vivo*, включително фармакокинетика, дистрибуция и потенциални странични влияния върху нецелелеви човешки клетки.

Моделът има някои ограничения в същото време: (1) Краткотрайност и устойчивост на присадката: РВМС от възрастен донор не персистират дълго в мишката; (2) Потенциална възможност за реакция срещу мишия организъм (GvHD); (3) Липса на пълноценна човешка среда: Понякога човешките клетки не получават нужните сигнали, или обратното – мишите клетки не реагират на човешките сигнални молекули. Отделяните от човешките Th2 могат да не взаимодействат оптимално с рецепторите на мишите еозинофили или епителни клетки, което може да изменя картината на възпалението. (4) Ограничен вроден имунитет: При РВМС трансфер липсват човешки неутрофили, еозинофили и базофили (те не се прехвърлят във фракцията на РВМС), поради което моделът на възпаление би могъл да е лимитиран в известна степен спрямо реални човешки. В този модел човешкият CR1 се експресира главно върху въведените човешки В лимфоцити, поради което крос-видовите взаимодействия със системата на комплемента на мишката са ограничени поради видовата специфичност на последния. Човешкият CR1 може да не свърже ефективно миши С3b, което означава, че човешките В-клетки в модела вероятно не се регулират от комплемента както биха се регулирали *in vivo* при хората.

Въпреки, че моделите с хуманизирани мишки чрез трансплантация на хематопоетични стволови клетки (HSC) дават по дългосрочно възстановяване на цялата имунна система (включително развитие на В и Т клетки вътре в мишката), те са по-комплексни и бавни, докато представения модел има за предимство бързина и относително по-малка сложност, съответно по-висока репродуцируемост.

Основната идея зад използването на химерни молекули е селективното елиминиране на алерген-специфичните В клетки, които продуцират IgE антитела срещу HDM. Химерните молекули се състоят от: Моноклонално антитяло, специфично за инхибиторен рецептор върху В клетките (човешки CR1 или миши FcγRIIb). Алергенен епитоп (Dp52 71) от *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1), който разпознава и свързва Der p 1 специфичните В-клетки. Свързване на химерната молекула към алерген-специфичните В-клетки чрез BCR (В-клетъчния рецептор), разпознаващ Der p 1 епитопа, води и до едновременно активиране на инхибиторния рецептор (CR1 или FcγRIIb), което води до сигнална каскада, потискаща активността и преживяемостта на В-клетката. В резултат, тези клетки загиват или спират да произвеждат IgE, намалявайки алергичния отговор.

За да се определи дали химерите намаляват алерген-специфичния имунен отговор и белодробното възпаление са проследени следните показатели: нива на анти Der p 1 IgE антитела в BALF (бронхоалвеоларен лаваж), мастоцитна дегрануляция (β-хексозаминидазна активност), фенотипизиране на белодробни инфилтрати чрез FACS, хистологичен анализ на белите дробове.

Резултати от хуманизирания Rag2-γс- модел: значително намалява нивата на анти-Der p 1 IgE в BALF спрямо контролната група, намалена дегрануляция на мастоцитите и по-ниска инфилтрация на възпалителни клетки (особено лимфоцити) в белите дробове, с редуция на хистологичните данни за възпаление.

**Въпроси:** Поради използването на моноклонално антитяло за генериране на химерното би специфично антитяло, имам въпроси относно анти-CR1 специфичността му. Има ли структурни алотипове на CR1, от наличните четири свързани с вариация им брой на повторени домени (“long homologous repeats”), които антитялото би могло да пропусне? Поради това, че честота на разпространение на различните алотипи на CR1 е расово-специфична до известна степен, бихте ли създали в бъдеще и други варианти на антитялото или това не е наложително (ако се разпознава домена на CR1 свързващ C3b/C4b)?

Възможно ли е да има известни единични нуклеотидни полиморфизми, които биха могли да доведат до по-ниска разпознаваемост? Например единичните полиморфизми в екзон 29, чиито засегнати продукти са локализираны екстрацелуларно и дефинират кръвно груповите антигени от системата Knops? Имате ли в предвид подобни феномени при разработка на следващи поколения химерни молекули?

2. Хроничен миши модел на алергия (BALB/с мишки): При него се използва BALB/с миши модел, при който мишките са сенсibiliзирани и предизвикани многократно с HDM алергени за създаване на хронично алергично възпаление. Чрез този модел се проследяват дългосрочните ефекти на терапията и влиянието ѝ върху системния и локален имунен отговор. Мишките са третирани с Dp52-71 химерни молекули и са измерени нивата на анти-HDM IgE, IgG1, IgA, IgM в серума и BALF, цитокиновия профил (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) в BALF.

При този модел серумните нива на IgE и IgG1 към HDM и равнищата на възпалителните цитокини в BALF са значително намалени при третираните с химерни молекули мишки,

което показва намалена Th2-медирана имунна активация. Наблюдават се намалена инфилтрация на еозинофили значително по-слабо възпаление в белите дробове.

Може да се заключи, че химерните молекули ефективно елиминират алерген специфичните В клетки и намаляват IgE-зависимия имунен отговор и в двата модела, намалявайки възпалителния процес в белите дробове

В заключение, въпреки че данните от хуманизирания и BALB/c модела не могат да се свържат директно поради различната им клетъчна и имунна среда, те заедно дават всеобхватна картина на терапевтичния потенциал на химерната молекула. Първият модел потвърждава ефективността на терапията върху човешките имунни клетки, докато вторият модел – макар и с миши компоненти – позволява надграждане чрез по продължителен и комплексен анализ на промените, настъпващи при алергичната реакция. Този синергичен подход е от съществено значение за оценката на потенциалната клинична приложимост на новата терапия

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

Дисертационният труд, обхващащ 106 страници и съдържащ 2 таблици и 29 фигури, се отличава с изчерпателен и систематичен подход към изучаването на свръхчувствителността и алергиите. Трудът започва с обширен литературен обзор, който поставя теоретичната основа за формулиране на нова научна хипотеза – селективно потискане на алерген-специфичните В-клетки чрез протеиново инженерни молекули. Теоретичната част (около 30 страници) представя съвременни теории и подходи за лечение на алергии, включително хипотези за терапия, която таргетира специфични В-клетки и широко обосновани научни дефиниции. Анализът по глави интегрира съвременните концепции в имунологията с детайлно описание на два експериментални миши модела: хуманизираният Rag2  $\gamma$ c- модел, при който PBMCs от алергични пациенти се въвеждат в имунодефицитни мишки и класическият BALB/c модел, в който чрез многократно сенсibiliзиране се симулира хронично алергично възпаление. Използваните методи (FACS, ELISA, хистопатологичен анализ) осигуряват висока достоверност на данните и доказват, че иновативният подход води до значително намаляване на IgE-продукцията и възпалителния отговор. Аналитично е написана дискусията, с критично и обективно представяне на хипотези, находки, изводи. Приносите са стойностни, представени са кратко и без спекулативност, което дава изключителна тежест на работата.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Научните приноси на дисертацията на Никола Ралчев са значителни както в теоретичен, така и в приложен аспект. Основният научен принос с фундаментално значение е демонстрирането на свръхекспресията на Fc $\gamma$ RIIb рецептора върху В лимфоцитите, включително IgE позитивните В клетки, в контекста на алергия към домашен прах, което представя ново разбиране за участието на Fc $\gamma$ RIIb в алергичните реакции. Това откритие предлага нова перспектива в патогенезата на алергията и може да има потенциал за бъдещи изследвания в имунологично медицинската наука, свързани със специфичното регулиране на

IgE-продуциращите В клетки. Допълнителен научен принос е установената връзка между нивата на анти HDM IgG1 антитела със специфични показатели за алергична възпалителна активност, което може да разкрие ролята на IgG1 антителата в патогенезата на HDM алергия и да подпомогне разширени изследвания на това взаимодействие. От научно приложна гледна точка, дисертацията представя реална иновация със създаване на два експериментални мишия модел за алергия към домашен прах – хуманизиран и хроничен, които осигуряват солидна научна база за по-нататъшни изследвания на механизмите на заболяването и изпитания на нови терапевтични подходи. Използваната протеин-инженерна химерна технология за селективно елиминиране на алерген-специфични В клетки демонстрира значителен терапевтичен потенциал. Не само, че тази технология предлага нови възможности за специфична терапия на алергии, но също така поставя основите за разработването на терапевтични средства, които могат да бъдат адаптирани към индивидуални характеристики на пациентите и съответните им имунологични профили. Тези научни и научно-приложни постижения доказват, че методологията, основана на химерни молекули и специфични мишия модели, има голям потенциал за бъдещи клинични изследвания и внедряване в практиката за лечение на алергични заболявания, като предоставя важен инструмент за разширяване на съвременните терапевтични подходи.

## **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд и лично участие на докторанта**

Никола Ралчев има значителен личен принос в проведеното дисертационно изследване, което се потвърждава от активното му участие в публикуваните научни резултати. Той е първи автор и в двете публикации, които са с ИФ, и най-високи квартили Q1 Q2. Той е съавтор в общо 15 научни публикации, като в 5 от тях е първи автор, което многократно надхвърля продукцията на докторант. Това ясно показва, че неговият принос не се ограничава само до техническа или експериментална работа, а обхваща цялостния процес на научното изследване – от планирането и изпълнението на експериментите до анализа на резултатите и оформянето на публикациите. Фактът, че е първи автор в значителен брой от тези публикации, подчертава неговата водеща роля в разработването на концепцията, дизайна на изследването и интерпретацията на данните. Водещото му участие в проучванията, както и съществените му научни постижения, дават основание да се заключи, че формулираните приноси и получените резултати в дисертацията са в преобладаваща степен негова лична заслуга.

## **9. Автореферат**

Авторефератът е изключително добре структуриран и отговаря на изискванията на съответните правилници, като ясно формулира целите, методологията и основните постижения на дисертационния труд. Той адекватно отразява ключовите резултати, свързани с иновативния терапевтичен подход за селективно потискане на алерген-специфичните В клетки, както и приноса на използваните хуманизирани и BALB/c мишия модели за установяване на ефекта върху IgE продукцията и възпалителния отговор. Това потвърждава,

че авторефератът представя съществените научни и научно-приложни резултати от дисертацията по ясен и обоснован начин.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд показва, че докторантът Никола Ралчев Ралчев притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Имунология“, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на Никола Ралчев Ралчев в докторска програма по „Имунология“.

24.2.25г.

София

Рецензент:

проф. дбн К. Тодорова