

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на редовен докторант Ванчо Донеv на тема „Охарактеризиране на потенциалните

имунопрофилактични и имунотерапевтични

свойства на човешка кръвна плазма“

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Докторска програма „ИМУНОЛОГИЯ“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и

информатика

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

Научна специалност: Имунология

Научен ръководител: доц. д-р Георги Николов, дм

**Биографични данни за кандидата:** Ванчо Донеv е роден на 17.06.1994г. в град Кавадарци, Република Северна Македония. След завършване на гимназиалното си образование в родния си град през 2013 г., изучава молекулярна биология в Биологичния факултет на СУ „Климент Охридски“ и придобива последователно бакалавърска (2017 г.) и магистърска степен (2019 г.). Има магистърска степен и по „Бизнес администрация и бизнес комуникации“ (2019 г.) от УНСС. Настоящият дисертационният труд е разработен и предложен за защита в НЦЗПБ „БулБИО“.

Дисертационният труд е написан върху 130 стр. и съдържа следните раздели: увод и литературен обзор – 39 стр., цел и задачи - 2 стр., материали и методи – 16 стр., резултати – 25 стр., обсъждане – 11 стр., изводи и приноси – 6 стр., литература – 29 стр. с 317 заглавия на английски език, научни статии и участие в научни форуми във връзка със защитата – 2 стр. В началото е представен и списък с използваните съкращения. В текста са включени 7 таблици и 23 фигури.

**Актуалност на темата.** Опити за преливане на кръв са правени още през втората половина на XIX век, но откриването на кръвните групи в началото на XX век от Карл Ландщайнер и последващата необходимост от големи количества кръв по време на двете световни войни, довеждат до масовото приложение на кръвопреливането като терапевтична процедура. Постепенно се разработват и процедури за отделянето и съхранението не само

1. Плазми: 90 броя COVID-19 реконвалесцентна донорска плазма, събрана в периода 1 януари-5 май 2021 г.; 32 броя от клинично здрави лица, 10 броя плазмени пулове събрани в периода януари-декември от 2001 г.

2. IVIG (Имуновенин-интакт 5%): – 90 бр. редовни производствени серии от 2019-2024 г. и партии от плазми, събрани по време на COVID-19 пандемията – 13 бр.

За определяне на различните антитела са използвани:

А. Иммуоензимни методи, базирани на ELISA технологията:

- за определяне на RBD-IgG и -IgA антитела срещу SARS-CoV-2

- за определяне на специфични IgG срещу *Candida albicans*

- home made имуоензимен метод за определяне на анти- H1a антитела в два варианта

- метод за определяне на антинуклеарни антитела (ANA )

Б. Имуноблот метод за определяне на ANA Profile

В. Luminex технология

-количествен метод за определяне на голям брой цитокини в pg/ml

-набор за определяне на неутрализиращи антитела срещу различни варианти на SARS-CoV-

2. Определя се % на антителата към оригиналния див тип вирус и пет варианта - B.1.1.529 (o), B.1.617.2 (δ), P.1 (γ), B.1.351 (β) и B.1.1.7 (α)

- количествен метод за определяне на имуноглобулиновите класове и изотипа на IgG –в g/L

Авторът е използвал предимно готови набори за изследване. Изключение прави методът за определяне стафилококовите антителата, който е разработен съобразно нуждите на дисертационния труд. По същество всички методи са основани на принципа на използването на белязани с ензим или флуорохром антитела. Във всички разработки се определят главно антитела от клас IgG, с изключение на антителата срещу SARS-CoV-2, където са определени и IgA антителата, и цитокините, където са определени самите молекули. Една част от получените резултати дават представа за концентрацията на изследваните вещества, друга част – имат полуколичествен характер. Позволявам си да

уточня понятието за субстрата в използваните методи – всъщност правилно е да се използва изрза „комплекс хромоген/субстрат“, където истинския субстрат на ензима пероксидаза е водородния прекис, а ТМВ е веществото (хромоген), което е индикатор на степента на положителната реакция чрез промяна на цвета си, което се отчита спектрофотометрично. Като ненужно в раздела „Резултати“ намирам детайлното описание на получаването на Имуновенин интакт 5%, тъй като това е вече известен търговски продукт, произведен в БулБио-НЦЗПБ ЕАД.

## **Резултати**

**А.Сеумни имуноглобулини в IVIG и в рековалесцентна плазма:** Направената характеристика на 11 партии IVIG, произведени в една година, показва че промените в различни показатели между различните партии е под 2 %, а разпределението на IgG1,2,3,4, IgA, IgM в 90 партии възпроизвежда типичните стойности за човешка плазма. Средната концентрация на IgG2 в рековалесцентна плазма е най-висока - 7,01 g/L, следвана от IgG1 (5,15 g/L), IgG3 (1,12 g/L) и IgG4 (0,21 g/L). Средната концентрации на IgA е 0.5 g/L, на IgM – 3.34 g/L на Ig E - 0,0006 g/L.

**Б.Проучвания върху антителата и цитокините в рековалесцентна плазма и IVIG:** SARS-CoV-2 RBD-специфичен IgG се открива в 63% (57/90) от изследваните плазми на преболедували от COVID 19, като средната концентарция е  $3,11 \pm 2,9$ . Anti SARS-CoV-2 IgA е открит в 59% (53/90) от пробите със средни стойности  $3,50 \pm 2,27$ . При 27.7 % от преболедувалите не са установени нито IgG, нито IgA антитела. Партии IVIG, произведени в пре-пандемичния период не съдържат IgG и IgA антитела срещу SARS-CoV-2, но по време на пандемията има значително увеличение на специфично IgG и по-малко на IgA антитела. Средното ниво на IgG антитела в Имуновенин интакт е по-високо от това в плазмите на преболедували инфекцията.

Средната неутрализираща активност на антителата срещу SARS-CoV-2 в плазмите на преболедували от COVID 19 варира от 54,2% за Delta варианта до 85,4% за Omicron. При 39/57 (68,42%) от рековалесцентните плазми са намерени неутрализиращи антитела за всички подтипове на варианти на SARS-CoV-2 и почти всички (94,7%) могат да неутрализират поне един вариант. Не е установена корелация между нивото на RBD-IgG или RBD-IgA и общата неутрализираща активност на RBD-позитивните проби.

Неутрализиращата активност на анти-SARS-CoV-2 антителата спрямо различни варианти на вируса (див тип, алфа, бета, гама, делта, о-микрон) е изследвана в 13 IVIG проби като е установено че тя е най-висока за алфа варианта и най-ниска за гама-варианта, но във всички проби е налице активност срещу някой от вариантите на вируса. Не е намерена зависимост между титъра на специфични антитела и неутрализиращият им ефект.

В 90 рековалесцентни плазми е изследвана концентрацията на 25 цитокина (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF- $\alpha$ ; IL-9, IL-10, IL-17A (CTLA-8), IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$ , IL-1RA, IL-7, IL-15, IL-31 и TNF- $\beta$ ). Във всички анализирани проби се наблюдават значително повишени концентрации на IL-18 със средно ниво от 54,05 pg/ml; IL-27 е повишен в 92,2% (83/90) от пробите, (средно 18,23 pg/ml), а IL-1RA – в 76/90 (84,4%) (средно 222,96 pg/ml). Останалите молекули са повишени в различни концентрации и в различен процент от пробите. IL-22 и IL-10 в RBD-двойно положителните за IgG и IgA пациенти са многократно по-високи от тези в двойно-отрицателните пациенти.

Сравнителният анализ между сборни плазми за производство на Имуновенин – интакт 5%, събрани по време на Covid-19 пандемията и хиперимунни плазми от индивидуални донори, преболедували Covid-19 показва увеличена експресия на IL-1RA в три и IL-9 в една хиперимунна донорска плазма, докато при сборните плазми не се откриват повишени нива на цитокини.

**В. Антитела срещу *Candida albicans*:** Във всички 90 партиди IVIG 5% се установяват антитела срещу *Candida albicans* в концентрация, по-висока от произволно избрани серуми.

**Г. Антитела срещу *Staphylococcus aureus* в IVIG 5%:** Авторът е разработил 2 имуноензимни теста за доказване на IgG антителата срещу алфа-хемолизин. Установени са оптималните условия за провеждането им. Установено е че в 89/90 IVIG партиди концентрацията е по-висока от тази на концентрацията на IgG алфа-хемолизин антителата в серума на здрави донори.

**Д. Детекция и характеризирание на АНА в Имуновенин-интакт 5% и рековалесцентна плазма:** Всички COVID 19-рековалесцентните плазми са отрицателни за АНА, докато във всички партиди IVIG се доказват тези антитела. Направена е характеристика на 5 от тези

партиди (с най-високи нива на АНА) и е установено че в 2 от тях с особено високи нива са анти- Ro-52 и анти-АМА-М2 антителата.

**Обсъждане:** Според даните в настоящия дисертационен труд концентрацията и разпределението на класовете и подкласовете имуноглобулини в българския IVIG имат същото разпределение като нивото при възрастни здрави хора.

Един от основните акценти в проучванията на Ванчо Добрев е изследването на състава на рековалесцентна плазма след преболедуване от COVID 19. Според него най-висока е средната концентрация на IgG2, следван от IgG1, IgG3 и IgG4, което той обяснява с много високи концентрации в 4 от изследваните проби. RBD-специфичните IgG и IgA са едновременно повишени в 50% от плазмите, при 27.7 % тези антитела са едновременно отрицателни, при 13 % са позитивни само IgG антителата, а в 8.8 % - само IgA. Тези данни са сходни с тези, получени и от други автори. Важно за науката и практиката е характеристиката на образуваните неутрализиращи антитела срещу SARS-CoV-2 и тяхната концентрация в рековалесцентна плазма. Този въпрос се обсъжда през целия период на COVID 19 пандемията, а и след това, и тук авторът се намесва компетентно като доказва че 39/57 (68,42%) от рековалесцентните плазми съдържат неутрализиращи антитела за всички подтипове на варианти на SARS-CoV-2 и почти всички (94,7%) могат да неутрализират повече от един вариант. Всички COVID 19-рековалесцентните плазми са отрицателни за АНА. Наблюдения от този вид са важни с оглед на все още неотпадналата необходимост за лечение на определени случаи на COVID 19 с рековалесцентна плазма.

Разбира се, важен извод за практиката е, че неутрализиращата активност на IgG антителата в различни партиди на българския IVIG Имуновенин-интакт 5% спрямо няколко вариантите на SARS-CoV-2 варира от 75,5% до 91,5%, а сравнението с реконвалесцентна плазма не показва значителна разлика в неутрализиращата активност. Това наблюдение е в синхрон с данните и на други автори.

Изхождайки от данните за значението на т.нар. „цитокинова буря“ като един от факторите за влошаване на състоянието на болните от COVID 19, авторът изследва съдържанието на 25 цитокина в рековалесцентна плазма и установява значително повишение на някои от тях като напр. IL 18, IL-27, IL 1RA. IL 22 и IL 10 са повишени главно в реконвалесцентните плазми на пациенти с двойно положителни IgG и IgA RBD антитела.

Литературните данни за цитокиновия състав на рековалесцентната донорска плазма са противоречиви и затова наблюдението на Ванчо Дончев имат принос към този въпрос.

Принос към изследването на състава на българския препарат Имуновенин интакт 5% е доказването на високо ниво на специфични анти-*Candida albicans* IgG във всички изследвани 90 партии, както и на специфични IgG към Hla в 89/90 партии. За изследване на специфични IgG към Hla е разработен и валидиран имуноензимен метод. Тези данни представят Имуновенин интакт 5% като продукт с изразени антибактериални и антимикотични свойства, които могат да се използват при лечението на заболявания, причинени от *Candida albicans* и *Staphylococcus aureus*. Имунотерапевтичният ефект на българския IVIG при хронични възпалителни заболявания е добре проучен, а данните в настоящия труд представляват ново поле за изследване както по отношение на антителата срещу *Candida albicans*, така и на тези срещу *Staph. aureus*.

Наличието на антитела срещу нуклеарни антигени в имуноглобулинови препарати за интравенозно приложение е дискутабилно. Авторът на настоящия труд се намесва в тази дискусия като според неговите данни тези антитела присъстват в 90-те изследвани от него серии Имуновенин интакт 5%. Направеният опит за оценка на вида на тези антитела в 5 серии показва че особено чести са анти- Ro-52 и анти-AMA-M2 антителата. Въпросът за значението на присъствието на ANA в имуноглобулиновите препарати все още не е намерил своето решение. Авторът на дисертационния труд правилно свързва тази находка с факта, че ANA се образуват в хода на някои автоимунни болести, но много често и след вирусни и бактериални инфекции и персистират продължително време след това, въпреки че здравият кръводарител няма симптоми на болестта. Друг известен факт е че в ниски концентрации ANA се установяват и при 5 % от здравите хора, както и при пациенти, преболедували от туберкулоза или онкологично заболяване. В същото време IVIG са една алтернатива на имunosупресивната терапия при системния лупус и други автоимунни болести. Тези факти се обсъждат много внимателно от автора на дисертационния труд.

**Изводи и приноси:** Съгласна съм с направените изводи и посочените приноси, но считам че към формулировката на извод N 4 (нива на цитокините в изследваните рековалесцентна плазма и IVIG) и N 9 (нива на ANA в IVIG) трябва да се подхожда с известна предпазливост, предвид мощното действие на тези биологично активни молекули.

**Литература:** Добре подбрани автори, вкл. и в исторически аспект.

**Авторефератът** отразява основните достижения на автора по изследвания въпрос.

**Заклучение:** Темата на дисертационния труд е интересна, авторът е направил редица изследвания върху българския IVIG, които разширяват погледа ни върху важни и донякъде малко известни качества на този продукт. Освен това се прави мащабно проучване върху състава на рековалесцентната плазма след преболедуване от COVID 19 и на имуноглобулиновите препарати, по време на SARS-CoV-2 инфекцията и след това. Много добро впечатление прави участието на автора в публикации в списания с IF. Направените от мен забележки са доброжелателни и с пропедевтичен характер. Те не повлияват положителното ми мнение за този дисертационен труд.

Считам че представените материали съответстват напълно на Закона за развитие на академичния състав в Р България и Правилника за неговото прилагане и както и на Правилника на НЦЗПБ. Убедено гласувам положително за присъждането и образователната и научна и степен „ДОКТОР“ на ВАНЧО ДОНЕВ в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3 Биологически науки и Научна специалност: Имунология.

12.8.2025 г.

Рецензент:



проф. д-р Марта Петрова Балева-Николова, дмн