

## РЕЦЕНЗИЯ



на дисертация „Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки на базата на магнитни наночастици“,  
представена от Димитрина Румянова Кръстева – докторант в катедра „Биотехнология“ при Университет „Проф. д-р Асен Златаров“, гр. Бургас, за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини), шифър: 02.11.11.

Рецензент: доц. д-р Недялка Димова Димова

Димитрина Кръстева е завършила Университет по хранителни технологии, г. Пловдив, специалност „Технолог на напитки“ през 2009 г. През юли 2016 г. е придобила магистърска степен инженер-биотехнолог по програма „Анализ и контрол на храни“ в катедра „Биотехнология“ на У „Проф. д-р Ас. Златаров“, Бургас, а от 01 юли 2017 г. е зачислена на редовна докторантура в същата катедра. Междувременно в периода от 2019 – 2020 г., след следдипломна специализация в Университета придобива и две квалификации „учител“ по химия и по биология.

От септември 2020 г. заема длъжност хоноруван преподавател в Университета, като взема участие в подготовката и води упражнения по дисциплините Молекулярна биология, Имунология, Генно инженерство, Производство на алкохолни напитки, Основи на инженерната биотехнология и Технологично обзавеждане в хранително-вкусовата промишленост.

Научно-изследователската работа на Димитрина Кръстева е свързана с разработване на китове за анализ на бактерии и приложението им в биотехнологичната промишленост по проект BG16RFOP002-1.005-0031-C01 и разработване на иновативен продукт – образен цитометър „Hand-held“, финансиран от Оперативна програма „Иновации и конкурентоспособност“, съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейския фонд за регионално развитие.

През последните години вниманието на много изследователи в световен мащаб е насочено върху приложението на стволовите клетки и тяхното качествено, и количествено оценяване. Трансплантацията на стволови клетки е много важно

решение при лечение на различни злокачествени и незлокачествени заболявания като левкемия, множествена миелома, някои автоимунни отклонения и др. Определянето на броя на жизнеспособните клетки е един от важните показатели за успешното провеждане на трансплантацията при лечението на пациентите. Именно това налага строг контрол на броя на тези клетки преди реинфузията им в организма на пациента.

Стволовите клетки обикновено експресират CD34 антигена върху клетъчната си мембрана. Затова броят на положителните CD34+ клетки от дълго време се приема като стандарт за количествено определяне на стволовите клетки. Съвременните техники за изброяване на CD34+ клетки включват флуоресцентна микроскопия, флуоресцентна поточна цитометрия и флуоресцентна образна цитометрия. Принципът на всички методи се основава на свързване на флуоресцентно белязано специфично анти-CD34+ антитяло с CD34+ антигена (CD34+ клетки). Флуоресцентният микроскопски метод отнема много време, а поточният цитометър е скъп и сложен апарат, и изисква квалифицирани специалисти. В тази връзка се предполага, че автоматичните образни цитометри са много перспективни за автоматично броене на CD34+ клетки, поради малкия си размер и лесно обслужване. За целта обаче е необходимо клетките предварително да бъдат изолирани и концентрирани за по-точно броене. Тук е целесъобразно използването на магнитни наночастици (МНЧ) като носители за имобилизация на конюгата моноклонално анти-CD34+ антитяло-флуоресцентно багрило.

Идеята на настоящата дисертация е разработване на нов, точен и бърз имунофлуоресцентен образно цитометричен метод за определяне броя на стволови клетки и левкоцити. Използването на МНЧ като носител за имобилизация на флуоресцентно белязано анти-CD34+ антитяло с цел изолиране и концентриране на стволовите клетки, ще доведе до осъществяване на по-прецизен и точен анализ. Имунореакциите протичат в псевдо-хомогенна среда, поради малкия размер на магнитните наночастиците (8 nm), а използването на магнитно поле осигурява отделянето на магнитните наночастици със свързания антиген от пробата за анализ. Преброяването ще се осигури благодарение на флуоресцентния маркер на специфичното антитяло. Това определя значението и актуалността на темата на дисертацията.

Дисертацията е структурирана и написана по общоприетия начин. Обемът ѝ е 177 страници. Тя съдържа разделите въведение, литературен обзор, цел и задачи, експериментална част, резултати и обсъждане, изводи, научни и приложни приноси, и литература. Включени са и списъци с публикациите по темата, участията на докторантката в конференции и студентски научни сесии, както и цитати. Декларация за оригиналност удостоверява истинността на проведените от докторантката експерименти и представените резултати.

Литературният обзор е оформен на базата на 207 литературни източника, един на български, останалите на английски език, а 70% от тях са публикувани след 2000 г., което показва актуалността на проблема и в международен мащаб. Обзорът обхваща 60 страници и съдържа богата, добре структурирана и подредена информация върху разглежданите проблеми, включваща 18 цветни илюстрации и фигури, и 2 таблици.

В обзора са разгледани структурата, функциите, предназначението на стволови клетки и левкоцити. Клиничното приложение на стволовите клетки включва автоложна и алогенна трансплантация. Всички имуноанализи се основават на специфичното разпознаване между антиген (Ag) и антитяло (Ab) чрез образуване на слаби нековалентни и хидрофобни взаимодействия. Основният компонент на един флуоресцентен имуноанализ за диагностика на клетки е флуоресцентно маркираното антитяло. Затова основно внимание е отделено на въпросите свързани с различните антитела, тяхната структура, производство, както и на такива отнасящи се до свойствата и приложението на някои от най-използваните флуоресцентни маркери (багрила). Други важни етапи в имуноанализа е получаването, пречистването и доказването на конюгати антитяло-флуоресцентен маркер. Разгледани са карбодимидният и глутаралдехидният метод за получаване на конюгатите, гелната електрофореза и хроматографските методи за пречистване на комплексите, като и спектроскопските методи за доказването им. В обзора определено място заема и получаването и функционализирането на магнитни наночастици (МНЧ) като носители за имобилизация на антителата. При функционализирането на повърхността на МНЧ се въвеждат функционални групи, чрез които се извършва имобилизацията на антитялото. В изложението по-нататък следват методите за имобилизация на антителата и въпросите свързани с моноклонални анти-CD34 и анти-CD45 антитела. Разгледани са и имунофлуоресцентните методи за броене на

стволови клетки. Така структуриран, логично последователен и обвързан с целите на дисертацията, обзорът илюстрира информираността и компетентността на докторантката по темата на дисертацията

Целите и основните направления на изследванията в дисертационната работа са дефинирани в третия раздел от дисертацията. За реализирането им са поставени 13 задачи – добре формулирани и в логична последователност. Те са разпределени в три направления: 1) Получаване, пречистване, доказване и определяне на активността на флуоресцентни конюгати на анти-CD34 и анти-CD45 антитяло; 2) получаване и функционализиране на МНЧ и имобилизация на конюгатите; 3) разработване на индивидуален имунофлуоресцентен анализ за определяне броя на CD34 клетки, както и разработване, и валидиране на хомогенен и хетерогенен имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба.

В Експериментална част са представени необходимите реагенти за получаване на флуоресцентни конюгати, за анализ на стволови клетки и необходимата апаратура за провежданите измервания и анализи. Описани са точно и подробно използваните при изследванията методи за: получаване, пречистване, доказване и определяне на активността на флуоресцентни конюгати на анти-CD34 и анти-CD45 антитяло с различни багрила – флуоресцеин изотиоцианат (FITC), dR 110 и АТТО; определяне на линейността и възпроизводимостта на анализа с новия флуоресцентен образен цитометър Easy Couter BC на фирмата Милкотроник, България; имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на броя на CD34 + и CD45 + клетки; получаване и функционализиране на МНЧ с АРТЕS (3-аминопропил триетоксисилан); имобилизация на конюгатите; статистически анализ на резултатите. Материалите, включени в тази част показват, че в методичен план дисертационният труд е разработен чрез подходящи и правилно подбрани методи за анализ и обработка на резултатите.

В раздела Резултати и обсъждане на 52 страници са представени резултатите по реда на задачите, формулирани в трети раздел. Те са поместени в 8 таблици и на 31 фигури.

В първия раздел са включени изследванията, свързани с разработване на хомогенен имунофлуоресцентен анализ за определяне броя на CD 34 (стволови клетки) клетки в периферна кръв и в аферезни проби. Първата задача е

получаване на флуоресцентните конюгати от специфични моноклонални антитела срещу CD34 клетки и флуоресцентни багрила. За синтез на флуоресцентни конюгати на анти-CD34 антитяло докторантката се е спряла на две флуоресцентни багрила - флуоресцеин изотиоцианат (FITC) и 6-dR110 (6-карбокси-4, 7-дихлорородамин 110). Синтезираните конюгати се пречистват от нереагиралите компоненти чрез молекулно-ситова хроматография. Основание за това дава разликата в абсорбционните максимуми на антителата и на багрилата, като и фактът, че получените конюгати имат най-голяма молекулна маса спрямо другите компоненти в системата и напускат първи колоната. За доказване на активността на получените флуоресцентни конюгати анти-CD34антитяло-FITC и анти-CD34антитяло-dR110 спрямо стволови клетки, имунохимичната реакция се отчита чрез микроскопско и образно-цитометрично визуализиране. Флуоресцентните снимки показват, че анти-CD34антитяло-FITC конюгатът оцветява стволовите клетки в зелено с по-слаба флуоресценция и значително по-голям фон. Това дава основание на докторантката да продължи да работи с конюгат на база багрило dR110, който дава ярко оцветяване на целевите клетки при незначителна фонова флуоресценция.

Следващата стъпка включва получаване и пречистване на флуоресцентен конюгат на CD45 клетки (левкоцити) с цел едновременното им определяне с CD34 клетките в една и съща проба. За целта са образувани, пречистени и доказани два конюгата на тези клетки с багрила АТТО465 и АТТО620. Изследвани са и флуоресцентните свойства на получените конюгати анти-CD45антитяло-АТТО465 и анти-CD45антитяло-АТТО620. Първият оцветява левкоцитите в зелено, а вторият – в червено. За едновременно определяне на двата вида клетки обаче е необходимо двата специфични конюгата да имат различни по цвят маркери, което определя за по-удачно да се работи с багрило АТТО620.

Определен е линейният интервал на измерване на CD34+ клетки с EasyCounter BC (от 22,75 до 606,66 cells/ $\mu$ L) и корелационния коефициент ( $R^2 = 0.99$ ), с което се доказва линейността и прецизността на флуоресцентния образен цитометър EasyCounter BC за изброяване на стволови клетки. На това основание е разработен имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне броя на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба с помощта на синтезираните конюгати и апарата EasyCounter BC. Получените резултатите са идентични и сравними с тези, получени от поточен цитометър и микроскоп Olympus.

Вторият раздел включва разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ за определяне на CD34 клетки. Важен компонент на хетерогенния имуноанализ е носителят за имобилизация на антитялото, чиято голяма специфична повърхност благоприятства степента на имобилизация на конюгатите. За тази цел в работата се използват магнитни наночастици със свързани на повърхността им аминокислотни групи за улесняване на имобилизацията. Получени, охарактеризирани и модифицирани са МНЧ, към които е имобилизиран конюгатът анти-CD34 антитяло-dR110. Броенето на CD34 клетки става с използването на флуоресцентния образен цитометър EasyCounter BC. Процедурата е прецизирана и с необходимата възпроизводимост на резултатите, което благодарение на имобилизирания конюгат върху МНЧ и прилагането на външно магнитно поле осигурява сепарирание и концентриране на свързаните към конюгата стволови клетки. Това налага изводът, че хетерогенният анализ е много подходящ за преброяване на CD34+ клетки в аферезни проби и в периферна кръв, съдържаща ниска концентрация на стволови клетки, поради възможността да се изолират и концентрират клетките чрез използването на магнитно поле. В заключение е разработен и имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на CD34 и CD45 клетки с имобилизирания конюгат анти-CD34 антитяло-dR110 върху МНЧ и анти-CD45антитяло-АТТ0620 при използване на EasyCounter BC.

В заключителната част са направени 15 обобщени извода, в които са резюмирани резултатите от изследванията по поставените задачи. Те са добре формулирани и произтичат изцяло от експерименталните резултати.

Научните и приложните постижения в докторската дисертация са представени чрез формулираните 3 научно-приложни приноси. Най-общо приносите могат да бъдат отнесени към категорията приноси, чрез които се обогатяват теоретичните и практическите знания в областта, в която са проведени изследванията.

Части от резултатите по дисертационната работа са публикувани в четири статии, от които две в списание с IF 2.877 - Anal Biochem. Статиите са в съавторство, като и в четирите Димитрина Кръстева е на първо място. По представените материали е открит един цитат на докторантката в научно списание с импакт фактор 6.155 (J Mater Sci Technol).

Част от научно-изследователската работа на Димитрина Кръстева е свързана с участието ѝ в три международни научни конференции в Констанца, Букурещ и Прага, и в две студентски научни сесии в Университета.

Авторефератът е в обем 64 страници и е със структура и съдържание, съответстващи на разделите Цел и задачи и Резултати и обсъждане от дисертацията.

Към най-значимите приноси на дисертационния труд, според мен, могат да се отнесат:

1. Разработването на индивидуален имунофлуоресцентен анализ за определяне на CD34+ клетки с използване на флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC за броене на клетките.
2. Разработването на хомогенен имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба с помощта на синтезираните конюгати на клетките с флуоресцентни маркери.
3. Създаване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+ клетки, и използването на МНЧ за имобилизирането им, което осигурява сепариране, концентриране и прецизно преброяване на стволови клетки в ниски концентрации.

Към оформянето, структурата и съдържанието на дисертационната работа имам следните забележки:

1. Мисля, че щеше да е по-добре за работата, ако в Експерименталната част по-подробно бяха представени използваните аналитични инструментални методи и апарати. Добре би било да се представи схема на новоразработения образен цитометър EasyCounter BC на фирма Milkotronic, за да е по-ясно даденото описание.
2. На стр. 75 е въведен терминът  $\epsilon$ -моларен **екстенционен** коефициент, което се повтаря и на следващи места в текста. Очевидно става въпрос за моларен **екстикционен** коефициент, но вместо този показател вече от доста години се използва терминът моларна абсорбируемост [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]. (Справка Георги Андреев, 2010, Молекулна спектроскопия, стр. 31).

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Има ли литературни данни за използване на багрилата ATTO и dR110, тъй като няма цитирани такива? Как избрахте да работите с тях?

2. Можете ли да обясните каква е разликата в принципа на действие на поточен цитометър и флуоресцентен образен цитометър?

### **Заклучение**

Дисертационната работа на Димитрина Кръстева е свързана с решаването на важни задачи, засягащи много случаи на жизненоважни решения, свързани приложението на стволови клетки, тяхното качествено и количествено оценяване при необходимост от трансплантация в случаи на злокачествени и незлокачествени заболявания. Тя представлява едно задълбочено изследване на възможностите за създаване на бързи и ефективни методи за изолиране и броене на стволови клетки в периферна и аферезна кръв. В процеса на разработване на дисертацията си докторантката е разширила и задълбочила своите знания в областта на имуноанализа със създаване на различни конюгати на целевите клетки и флуоресцентни багрила, и създаване на подходящи, и приложими методи за броене на стволовите клетки. Придобила е умения да събира и обработва научна информация, да планира и извършва експериментална дейност, да анализира и обобщава получените резултати.

По начина на разработване, структура, обем и съдържание, и постигнати научно-приложни приноси представената дисертационна работа отговаря на изискванията за докторска дисертация, което е основание да предложи на Научното жури да оцени положително научния труд и да присъди на Димитрина Румянова Кръстева образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини), шифър: 02.11.11.

Септември 2021 г.

Бургас

Подпис заличен  
Рецензент Чл.2 от ЗЗЛД  
/доц. д-р Н. Димова/