

## СТАНОВИЩЕ

От проф. д-н Алберт Иванов Кръстанов

За дисертационния труд **"Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки на базата на магнитни наночастици"**, представен от **ДИМИТРИНА РУМЯНОВА КРЪСТЕВА** за присъждане на образователна и научна степен **"ДОКТОР"**

Представената ми за становище дисертация е посветена на един актуален и изключително интересен проблем, отнасящ се за разработването на модерни и бързи методи с висока чувствителност и селективност за разделяне и количествено определяне на броя на стволови клетки в периферна кръв и в аферезни проби. Избраната тема на дисертацията представлява несъмнен интерес от научна и приложна гледна точка поради нарастващата необходимост от определянето на броя на жизнеспособните стволови клетки като един от важните показатели за успешното провеждане на трансплантация при лечението на пациенти. Именно това налага строг контрол на броя на тези клетки преди реинфузията им в организма на пациента.

През последното десетилетие много изследователи работят върху приложението на стволовите клетки и тяхното качествено и количествено оценяване. Трансплантацията на стволовите клетки е добро решение за различни злокачествени и незлокачествени заболявания като левкемия, хронична миеломоноцитна левкемия, множествена миелома, таласемия, някои автоимунни отклонения. Това определя тематиката на изследванията по дисертационния труд като изключително актуални и значими за съвременната медицина, диагностика и терапия.

Заглавието отразява лаконично целта и същността на проведените изследвания. В изложението ясно е очертана актуалността и необходимостта от това изследване в светлината на съвременната концепция за терапия на различни злокачествени и незлокачествени заболявания. Въз основа на прецизно проведените изследвания и критичното съпоставяне на получените резултати за първи път е разработен имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на стволови клетки и левкоцити (CD34+ и CD45+ клетки) с имобилизиран конюгат анти тяло-флуоресцентно багрило върху магнитни наночастици, осигуряващ сепариране и концентриране на свързаните към конюгата стволови клетки и съответно по прецизно преброяване. Дори само този резултат е достатъчен за да бъдат високо оценени научните и приложни приноси на дисертацията. Успоредно с това са синтезирани два нови конюгата за

определяне броя на CD34+ и CD45+ клетките - анти-CD34антитяло-dR110 и анти-CD45антитяло-АТТ0620. Доказана е възможността флуоресцентният образен цитометър EasyCounter BC да бъде използван за броене на стволови клетки и да осигури бърз, лесен и точен автоматичен анализ.

Особено добро впечатление прави подхода за използване на магнитни наночастици като носител за имобилизация на флуоресцентно маркирано специфично антитяло, което е много перспективна тенденция едновременно за изолиране и концентриране на стволовите клетки, и за тяхното преброяване. По този начин ще се осигури по-голяма прецизност и точност за броене на стволовите клетки. Така, концепцията заложена в настоящата дисертация за разработване на нов, точен, бърз и прост имунофлуоресцентен образно цитометричен метод за определяне броя на стволови клетки и левкоцити и използването на магнитни наночастици 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. Използването на магнитни наночастици като носител за имобилизация на флуоресцентно маркирано специфично антитяло е много перспективна тенденция едновременно за изолиране и концентриране на стволовите клетки, и за тяхното преброяване. Прилагането на новия флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC на фирма Милкотроник ЕООД, България позволява да се разработи бърз и лесен метод за броене на стволови клетки.

Представеният материал показва, че изпълнението на експерименталната работа е било добра школа за методическата подготовка на докторантката и в този смисъл е изпълнено предназначението на докторантурата като образователна степен.

Държа да подчертая, че експерименталната част от дисертационния труд е обемиста, задълбочена и прецизно изпълнена научна разработка с научни и научно-приложни приноси. Получените резултати и умелата им интерпретация убедително показват, че докторантката е методически и информационно подготвен изследовател. Като цяло дисертационният труд представлява добре обосновано, комплексно и завършено научно изследване със значими научно-приложни приноси. Постигнат е висок корелационен коефициент (0.97) между разработеният метод с имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху магнитни наночастици, с анти-CD45антитяло-АТТ0620 и със стандартен поточно-цитометричен метод. Доказано е, че хетерогенният метод е много подходящ за преброяване на стволови клетки в аферезни

проби и особено в периферна кръв, съдържаща ниска концентрация на стволови клетки, поради възможността да се изолират и концентрират клетките.

Разработеният проблем е актуален, но изпълнението му е сложно и изисква комплексни познания както в областта на органичната химия, така и в областта на медицина и имунология. Докторантката умело съчетава познанията си в тези области при решаване на проблемите свързани с разработване на дисертационния труд. Особено добро впечатление прави факта, че разработените методи предлагат много добра алтернатива, тъй като получените резултати са сравними с резултатите получени с други инструменти, както и с референтни китове.

Дисертацията е добре построена методично, изпълнена е прецизно на високо ниво с използване на разнообразни методи и с добре обработени и коректно представени резултати. Изпълнението се отличава с ясен и терминологично точен език. Дисертационния труд съдържа 172 страници, 10 таблици и 50 фигури. В библиографията са включени 207 заглавия. Представени са 4 публикации (едната подадена) във връзка с дисертационната работа, като две от тях са с импакт фактор и има вече цитирания. Докторантката е участвала в 3 международни конференции, представяйки резултати, включени в дисертационния труд. Всичко това още веднъж показва значимостта на представената разработка.

Материалът, включен в автореферата напълно отразява проведените изследвания в рамките на дисертацията.

Въз основа на всичко изложено до тук убедено предлагам на почитаемото научно жури да присъди на **ДИМИТРИНА РУМЯНОВА КРЪСТЕВА** образователната и научна степен **“ДОКТОР”**

20.08.2021

Пловдив

Рецензент:...

Подпис заличен

Чл.2 от ЗЗЛД

(проф. д-н Алберт Кръстанов)