

**МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ” – ГР.  
БУРГАС  
ФАКУЛТЕТ ПО ТЕХНИЧЕСКИ НАУКИ  
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

**ДИМИТРИНА РУМЯНОВА КРЪСТЕВА**

**Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки  
на базата на магнитни наночастици**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и  
научна степен „ДОКТОР” по научна специалност: 02.11.11.  
Технология на биологично активни вещества (вкл. ензими,  
хормони, белтъци)

---

БУРГАС, 2021

---

**МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ” – ГР.  
БУРГАС  
ФАКУЛТЕТ ПО ТЕХНИЧЕСКИ НАУКИ  
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

**ДИМИТРИНА РУМЯНОВА КРЪСТЕВА**

**Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки  
на базата на магнитни наночастици**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР” по научна специалност: 02.11.11. Технология на биологично активни вещества (вкл. ензими, хормони, белтъци)

Научни ръководители:  
Доц. д-р Катя Габровска и Доц. д-р Явор Иванов

---

БУРГАС, 2021

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет при катедра Биотехнология, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, на заседание, състояло се на 29.06.2021г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред жури, определено със заповед ..... на Ректора на Университет „Проф. д-р Асен Златаров”.

Дисертационният труд съдържа 177 страници, 10 таблици и 50 фигури. В библиографията са включени 207 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в зала ....., ОК, Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – гр. Бургас.

Материалите за защитата са на разположение на интересуващите се в деловодството на Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас.

Автор: Димитрина Румянова Кръстева

Заглавие: Имунофлуоресцентен анализ на стволони клетки на базата на магнитни наночастици

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

*APH-аферезна проба*

*APTES- 3-аминопропил триетоксисилан*

*BM- костен мозък*

*CFCA-колоно-формиращ клетъчен анализ*

*CV- коефициент на вариация*

*CB- кръв от пънна връв*

*dR 110- 6-карбокси-4, 7-дихлорородамин I 10*

*EDC- 1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид*

*FITC- флуоресцеин изотиоцианат*

*Flu-флуоресцентен маркер*

*GVHD-реакция на присадката срещу приемателя*

*HLA-човешки левкоцитен антиген*

*HSCs- хематопоеични стволови клетки*

*HSCT-хематопоеична стволово-клетъчна трансплантация*

*IgG- имуноглобулин G*

*ISHAGE- Международна асоциация по химиотерапия и присаждане*

*MPB-мобилизирана периферна кръв*

*NHS- N-хидроксисукцинимид*

*PBMCs- периферни кръвни мононуклеарни клетки*

*PBS - фосфатно буфериран физиологичен разтвор*

*PBSC-периферни кръвни стволови клетки*

*PB- периферна кръв*

*RBC- червени кръвни клетки*

*WBC- бели кръвни клетки*

*ГКТС-главен комплекс на тъканна съвместимост*

*МНЧ- магнитни наночастици*

## Въведение

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. Стволовите клетки, събрани чрез афереза подлежат на минимални манипулационни процедури като намаляване на обема, криоконсервация, размразяване. Криоконсервирането и размразяването на клетъчната популация може да повлияе върху жизнеспособността на тези клетки. 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. Именно за това, от десетилетия, броят на положителните CD34+ клетки е стандарт за количествено определяне на стволовите клетки. Експресията на CD34 антигена върху клетъчната мембрана е свързана с образуването на колонии в клетъчните култури и това е първият стандартен метод за количествено определяне на стволови клетки (анализ на колоно-формиращи единици). Този метод не е практичен, тъй като отнема много време (14 часа). Настоящите 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 и обикновено дава по-високи коефициенти на вариация. Понастоящем поточният цитометричен анализ е стандартния метод за изброяване на CD34+ клетките. Поточната цитометрия осигурява прецизно изолиране и изброяване на стволовите клетки, но апаратът е скъп и сложен, изисква квалифициран специалист и продължително време за анализ (2 часа). Автоматичните образни цитометри са с малък размер, по-практични и лесни за използване. Те са обещаващи апарати за автоматично броене на CD34+ клетки. В научната литература е демонстрирана способността на имунофлуоресцентен брояч на клетки ADAM II (NanoEntek, Сеул, Корея) да изброява едновременно CD34+ и CD45+ клетки (CD45 протеина е индикатор за левкоцитите) в една и съща проба. Концентрацията на CD34+ клетки в периферна кръв е незначителна, докато в аферезни проби е по-голяма. Но и в двата случая е необходимо предварително да бъдат изолирани и концентрирани, за да се получи точно броене на клетките с автоматичен образен цитометър. Това може с успех да бъде осъществено чрез използването на магнитни наночастици (МНЧ) като носители за имобилизация на конюгата моноклонално анти-CD34+ антитяло-флуоресцентно багрило.

Целта на настоящата дисертация е да се изследва способността на полученият имобилизиран конюгат анти-CD34+ моноклонално антитяло-dR110 върху магнитни наночастици (МНЧ) и свободен конюгат анти-CD45+ моноклонално антитяло-АТТ0620, както и на новия флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC (Милкотроник, България) за прецизно изброяване на CD34+ и CD45+ клетки в кръвни проби.

## **А. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Целта на настоящата дисертация е разработване на имунофлуоресцентен цитометричен анализ за едновременно определяне на броя на CD34+ клетки и CD45+ клетки в кръвни и аферезни проби, с помощта на синтезирани имуноконюгати в свободна и имобилизирана форма и флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC.

За целта са поставени следните задачи:

1. Получаване, пречистване и доказване на флуоресцентни конюгати на анти-CD34 антитяло.
2. Определяне на активността и подбор на синтезираните конюгати на анти-CD34 антитяло.
3. Получаване, пречистване и доказване на флуоресцентни конюгати на анти-CD45 антитяло.
4. Изолиране на левкоцити от кръвни проби.
5. Определяне на активността и подбор на синтезираните конюгати на анти-CD45 антитяло.
6. Разработване на индивидуален имунофлуоресцентен анализ за определяне броя на CD34 клетки при използването на подбрания флуоресцентен конюгат на анти-CD34 антитяло и флуоресцентния образен цитометър EasyCounter BC.
7. Разработване на хомогенен имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба и флуоресцентния образен цитометър EasyCounter BC.
8. Валидиране на имунофлуоресцентният анализ за едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки. Определяне на корелацията

на резултатите, с тези получени с референтни конюгати и стандартни апарати.

9. Получаване и функционализиране на магнитни наночастици.

10. Имобилизация на подобрения флуоресцентен конюгат на анти-CD34 антителя върху модифицираните магнитни наночастици.

11. Разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне броя на CD34+ и CD45+ клетки при използването на имобилизиран флуоресцентен конюгат на анти-CD34 антителя, на флуоресцентен конюгат на анти-CD45 антителя и апарата EasyCounter BC.

12. Валидиране на хетерогенния имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки.

13. Провеждане на анализи за едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки в проби от мобилизирана периферна кръв и в аферезни проби и сравнението им с референтния метод.

## **Б. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

### **I. Разработване на хомогенен имунофлуоресцентен анализ за определяне броя на CD 34 и CD 45 клетки чрез флуоресцентен образен цитометър EasyCounter**

Едни от най-важните компоненти за разработването на хомогенен имунофлуоресцентен микроскопски анализ за определяне броя на CD34 (стволови клетки) и CD45 клетки (левкоцити) в периферна кръв и в аферезни проби са флуоресцентните конюгати получени от специфични моноклонални антитела срещу CD34 и CD45 клетки и флуоресцентни багрила. За получаването на ефективни конюгати е важно да се подберат подходящи селективни антитела (от определен клас и клон) към целевите клетки. Необходим е и правилен избор на флуоресцентни багрила, осигуряващи



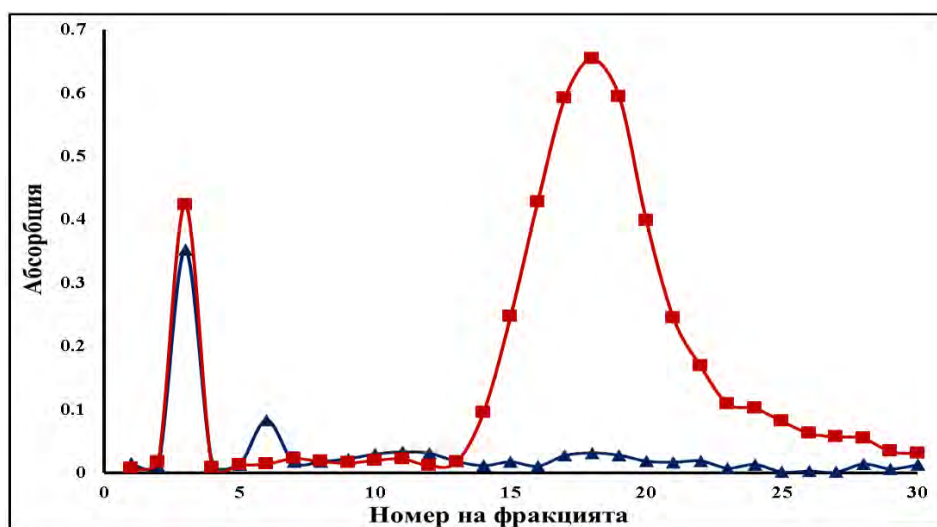
висок флуоресцентен добив и добра фотостабилност на конюгатите. Доказано е, че CD34 антителата от клас III, като 8G12 и 581 са много подходящи за разработване на този анализ, тъй като се влияят по-малко от отрицателно заредени въглехидратни части на сиаловата киселина, съдържаща се в CD34 антигена. Именно за това за приготвянето на конюгата анти-CD34 антитяло-флуоресцентно багрило е подбрано мише моноклонално анти-CD34 антитяло от клас III, клон 581. Подбрани са и две флуоресцентни багрила флуоресцеин изотиоцианат (FITC) и 6-dR110 (6-карбокси-4,7-дихлорородамин 110).

## **1. Получаване и пречистване на флуоресцентни конюгати на анти-CD34 антитяло.**

### **1.1. Получаване и пречистване на флуоресцентен конюгат анти-CD34 антитяло-FITC.**

Първият флуоресцентен конюгат на анти-CD34 антитяло е синтезиран с флуоресцеин изотиоцианат (FITC), тъй като той е един от най-често срещаните маркери на протеини. Амино групите на моноклоналното анти-CD34 антитяло от клас III, клон 581 се свързват с изотиоцианатните групи на флуоресцентното багрило FITC, при което се образуват тиокарбамидни връзки. Синтезираният конюгат след това се пречиства от нереагиралите компоненти чрез молекулно-ситова хроматография. За целта се използва колона с пълнеж Sephadex G25 Medium и се събират фракции по 2mL. На всяка получена фракция се измерва абсорбцията при 280 nm (характерен абсорбционен максимум за антитялото) и при 495 nm (характерен абсорбционен максимум за FITC). На фиг. 1 е представена гел-филтрационната хроматограма на полученият конюгат. В сравнение с останалите компоненти на реакционната смес, полученият конюгат има най-

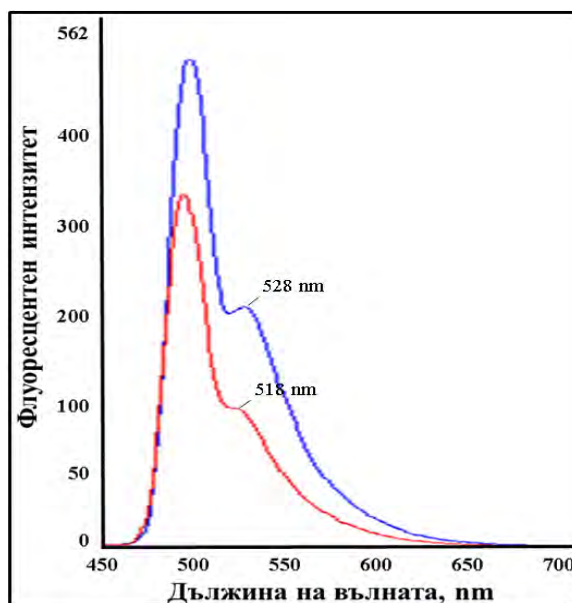
голяма молекулна маса, затова се открива във фракция 3. Първият пик на фиг. 1 съответства на пречистения конюгат (фракция 3) и той показва характерна абсорбция, както за антитялото, така и за флуоресцентното багрило. На базата на определените абсорбции на тази фракция са изчислени: концентрациите на IgG (анти-CD34 антитяло) и на FITC в конюгата и е изчислено съотношението FITC/протеин (F/P). Установено е, че конюгатът съдържа 99,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgG и съотношението F/P е 9,5. Изчисленият резултат за съотношението F/P е показателен за добро качество на получения конюгат и неговите флуоресцентни свойства, тъй като се счита, че оптималното съотношение F/P е в интервала 1 – 10. Вторият пик на фиг. 1 съответства на малък излишък на протеин, а третия пик е излишък от флуоресцентното багрило, което е с по-ниска молекулна маса и се елуира във фракциите от 13 до 23.



**Фиг. 1. Гел-филтрационна хроматограма на конюгата анти-CD34 антитяло-FITC. Абсорбция при 280 nm (▲) и 495 nm (■)**

За доказване на успешното свързване на антитялото с флуоресцентния маркер е изследван и неговия емисионен (флуоресцентен) спектър, и е

сравнен с този на несвързания FITC (фиг. 2.). Спектрите са направени на флуоресцентен спектрофотометър PerkinElmer LS45. Определено е, че свободният FITC има флуоресцентен максимум при 518 nm, а конюгатът антицяло-FITC при 528 nm. Това изместване на флуоресцентния максимум вероятно се дължи на свързването на флуоресцентното багрило с антицялото.



**Фиг. 2. Флуоресцентни спектри на конюгата анти-CD34 антицяло-FITC (син) и на флуоресцентното багрило FITC (червен)**

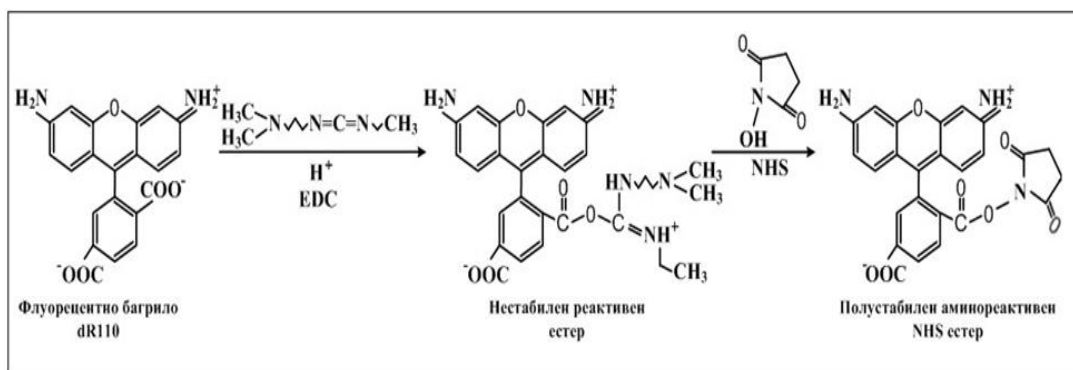
Установено е, че при по-продължително съхранение, полученият конюгат е нестабилен и флуоресцентният му интензитет се редуцира. Забелязва се намаляване на авидността на свързаното антицяло към антигена. Вероятната причина за това е, отрицателния заряд на молекулата на FITC, който се предава на целия конюгат. Известно е, че CD34 клетките показват висок нетен отрицателен заряд, поради големия брой остатъци от сиалова киселина, открити в техните домени. Именно за това свързването на отрицателно заредения конюгат антицяло-FITC към CD34 клетките се

затруднява. Освен това флуоресцентното багило FITC има фонова флуоресценция, която ще пречи на броенето на клетките. Поради тази причина се синтезира втори конюгат на анти-CD34 антитяло с флуоресцентното багило dR110.

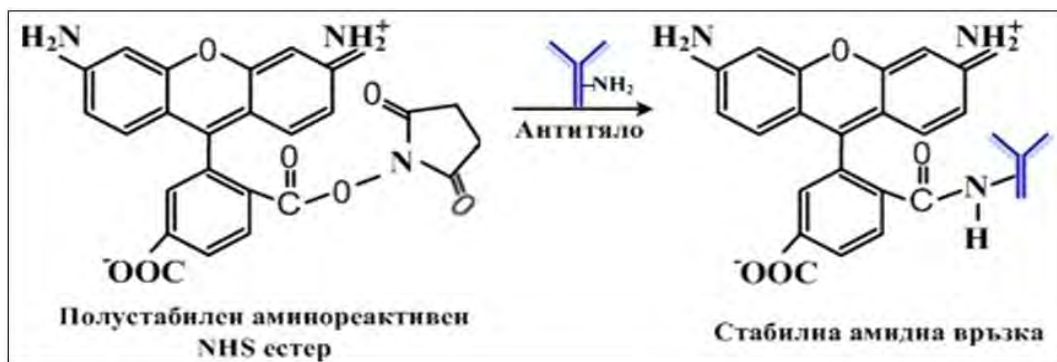
## 1.2. Получаване и пречистване на флуоресцентен конюгат анти - CD34 антитяло-dR110

Конюгатът анти-CD34антитяло-dR110 се получава по карбодиимиден метод посредством методика, описана в материали и методи. В сравнение с FITC, флуоресцентното багило 6-dR110 (6-карбокси-4, 7-дихлорородамин 110) има по-добра фотостабилност и по-слаба зависимост от рН. Багилото е синтезирано и пречистено в Милкотроник ЕООД. Неговият екстинционен и емисионен максимум са съответно при 491 и 518 nm. За разлика от FITC, това багило има слаба фонова емисия.

Принципната схема на конюгирането на анти-CD34 антитялото с флуоресцентното багило dR110 е представена на фиг. 3 и 4:



**Фиг. 3. Активиране на флуоресцентното багило dR110 с EDC и NHS**

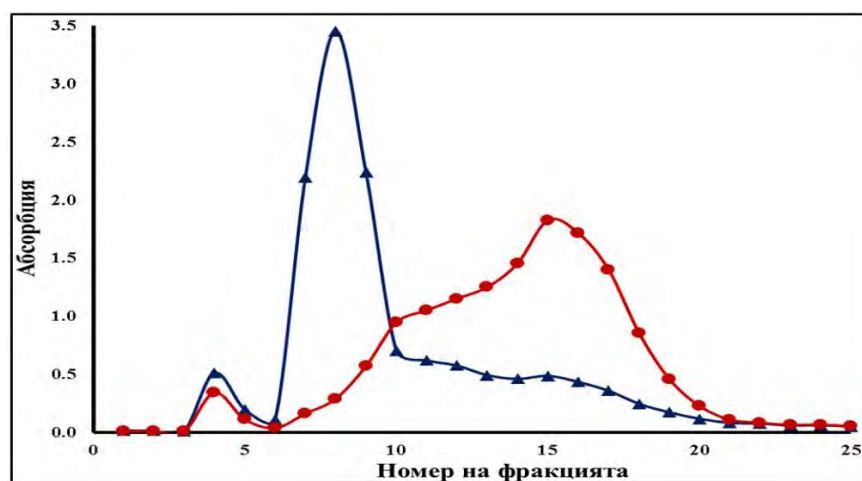


**Фиг. 4 . Конюгиране на анти-CD34 антитяло с активирано флуоресцентно багрило dR110**

Активирането на флуоресцентното багрило dR110 се извършва със смес от карбодиимид (EDC) и N-хидроксисукцинимид (NHS). Взаимодействат и двете карбоксилни групи и се образува стабилен междинен NHS-естер, с положителен заряд (на фигурата е представено взаимодействието само на едната карбоксилна група) . Последният реагира с амино групата на антитялото образувайки амидна връзка. По същия начин се осъществява и свързването и при втората карбоксилна група. Накрая се получава конюгат с положителен заряд. Предполага се, че този положителен заряд ще придаде по-голяма авидност и реактивоспособност на конюгата към отрицателно заредените CD34 клетки, за разлика от по-горе описания конюгат анти-CD34 антитяло–FITC.

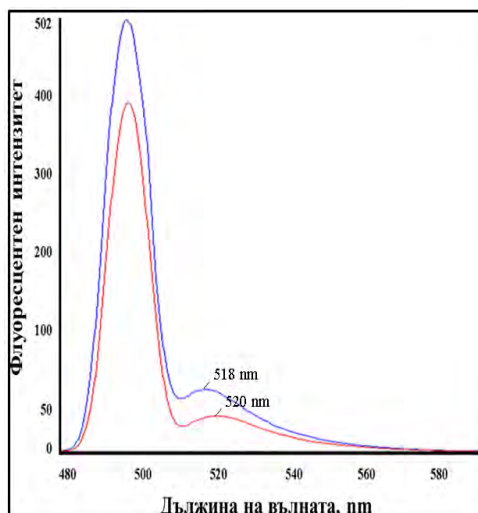
След инкубиране на антитялото с флуорохрома, сместа съдържа конюгат антитяло-флуоресцентно багрило, неконюгирано багрило и свободно антитяло. Конюгатът се пречиства чрез молекулно-ситова хроматография, като се използва колона с пълнеж на Sephadex G25 Medium. Конюгатът напуска най-напред колоната, тъй като в сместа той е с най-висока молекулна маса и се открива във фракция 4. Абсорбцията на всяка фракция се измерва при 280 и 491 nm с UV-Vis спектрофотометър (фиг. 5.). За да се докаже успешното свързване между компонентите, се изчислява концентрацията на

IgG в конюгата и съотношение флуоресцентно багрило/протеин (F/P). Установено е, че конюгатът (фракция 4) съдържа 93,45  $\mu\text{g}$  /mL IgG, а съотношението F/P е 1,19. Получената стойност на F/P, е в интервала на считаното за оптимално съотношение от 1 до 10 и показва, че конюгатът е със сравнително добро качество.



**Фиг. 5. Гел-филтрационна хроматограма на конюгат анти – CD34 антитяло–dR110. Абсорбция при 280 nm (▲) и 491 nm (●)**

На фигура 6 са показани флуоресцентните спектри на полученият конюгат анти-CD34антитяло–dR110 и на свободното флуоресцентно багрило (dR110). Анализите са извършени с флуоресцентен спектрофотометър PerkinElmer LS45. Свободното багрило има пик на емисия при 518 nm, а конюгатът анти-CD34 антитяло–dR110 има пик при 520 nm. Това изместване на максимума на емисията вероятно се дължи на свързването на антитяло с флуоресцентното багрило, т.е. образуването на конюгата.



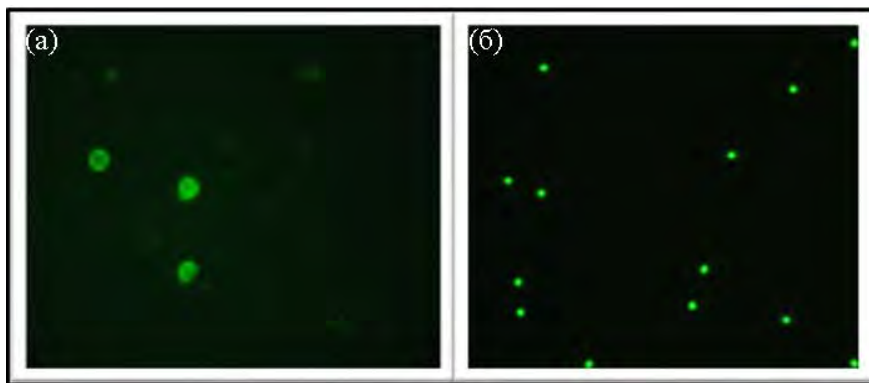
**Фиг. 6. Флуоресцентни спектри на конюгата анти-CD34 антитяло–dR110 (червен) и флуоресцентното багрило dR110 (син)**

**2. Доказване активността на флуоресцентните конюгати на анти-CD34 антитяло към стволови клетки (CD 34 клетки)**

За да се докаже активността на получените флуоресцентни конюгати анти-CD34антитяло–FITC и анти-CD34антитяло–dR110 се прилага микроскопско и образно-цитометрично визуализиране на стволови клетки от криоконсервирани аферезни проби, доставени от лаборатория по клинична хематология на болница „Св. Марина”, гр. Варна. Преди да се пристъпи към анализирането на стволовите клетки, те трябва да бъдат размразени. Съществуват различни методи за размразяване на аферезните проби, но най-добър и щадящ метод е размразяване на пробата на водна баня при 37 °C за 60 s.

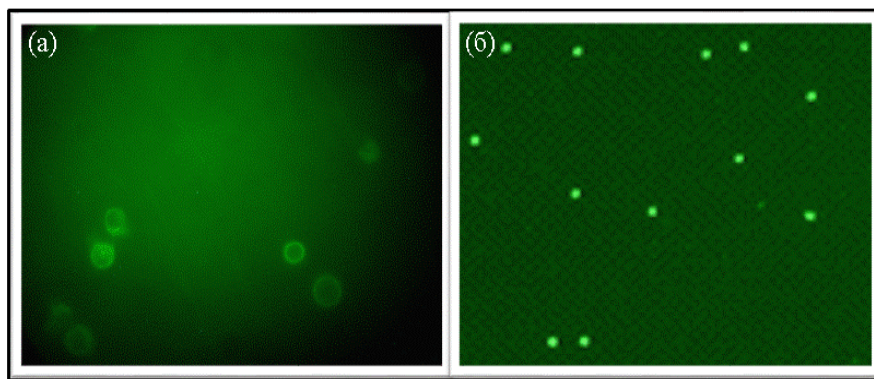
Размразената аферезната проба се разделя на две части и към двете проби се прибавят поотделно двата конюгата. След осъществяване на имунореакцията, аликвотна част от двете проби се анализират с флуоресцентен микроскоп Olympus и автоматичен брояч EasyCounter BC. На фигура 7 и фигура 8 са представени флуоресцентните изображения на

оцветените в зелено стволови клетки с двата конюгата, анализирани с по-горе споменатите апарати. Върху клетъчната мембрана на стволовите клетки се експресира CD34 протеин (антиген), който се счита като златен стандарт за количествено определяне на стволови клетки. Поради тази причина е прието, стволовите клетки да се наричат CD34 клетки”, и съответно се определя броя на CD34 клетките. На фигура 7 а , б ясно се вижда, че CD34 клетките флуоресцират и са оцветени зелено. Забелязва се зелен флуоресциращ пръстен на повърхността на клетките при микроскопските снимки с Olympus (x 40), тъй като неговото увеличение е по-голямо в сравнение с увеличението при EasyCounter BC (x 10). При сравняване на флуоресцентните снимки на двете фигури, ясно се вижда, че конюгатът анти-CD34антитяло–dR110 осигурява ярко оцветяване на целевите клетки и незначителна фонова флуоресценция, а анти-CD34 антитяло–FITC конюгата също оцветява стволовите клетки, но получената флуоресценция е по-слаба и фонът е значително по-голям. Затова, следващите анализи са извършени с анти-CD34 антитяло–dR110.



**Фиг. 7. Флуоресцентни изображения на CD34 клетки (а) с конюгат анти-CD34антитяло–dR110 на флуоресцентен микроскоп „Olympus“; (б) с анти-CD34антитяло–dR110 на образен цитометър „EasyCounter BC“.**

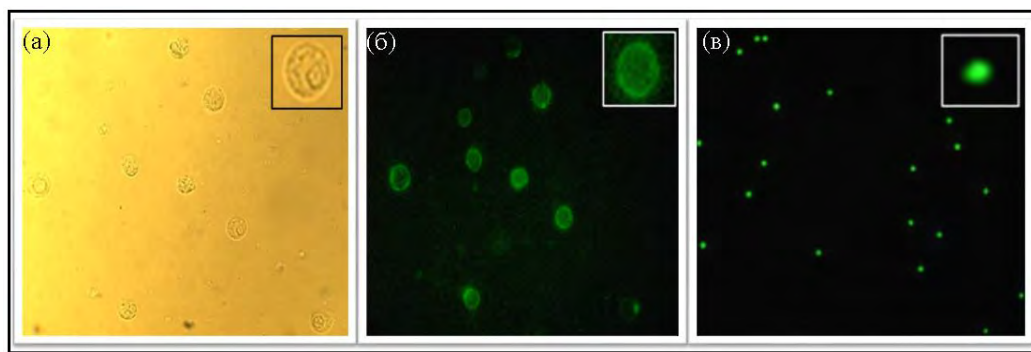




**Фиг. 8. Флуоресцентни изображения на CD34 клетки (а) с конюгат анти- CD34 антитяло–FITC на флуоресцентен микроскоп „Olympus“; (б) с анти- CD34 антитяло–FITC на образен цитометър „EasyCounter BC“.**

На фигура 9 (а и б) са представени съответно светлинните и флуоресцентните изображения на CD34 клетките от аферезна проба 1, свързани с конюгата анти-CD34антитяло–dR110, получени чрез флуоресцентен микроскоп „Olympus“. Забелязва се, че има пълно съответствие на светлинните и флуоресцентни изображения на CD34 клетките на двете снимки. Ясно се вижда флуоресцентния пръстен на клетъчната повърхност на стволовите клетки на фиг. 9б. Броят на CD34 клетките в аферезна проба 1, определен чрез флуоресцентния микроскоп е 125 cells/ $\mu$ L. Аликвотна част от същата проба 1 се измерва, за да се анализира броя на CD34 клетките с флуоресцентния образен цитометър „EasyCounter“ BC (Фиг. 9в). Определеният брой клетки с това устройство е близък до броя на стволовите клетки, измерен от микроскопа, а именно - 135 cells/ $\mu$ L. От фигура 9 (в) ясно се вижда, че размерът на клетките е по-малък и флуоресцентният пръстен по клетъчната повърхност не се забелязва. Това е така, тъй като увеличението на EasyCounter е 4 пъти по-малко (x10) от увеличението на микроскопа Olympus (x40). Освен това, наблюдаваната площ на полето при образния цитометър е по-голяма. Средният брой клетки

при EasyCounter се изчислява от 16 наблюдавани полета в резултат на което, получените резултати са по-точни и се гарантира постигането на по-нисък коефициент на вариация.



**Фиг. 9. (а) Светлинни изображения на CD34 и CD45 клетки в проба 1 и (б) флуоресцентни изображения на CD34 клетките в проба 1 с конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 чрез микроскоп Olympus (x40); (в) Флуоресцентни изображения на CD34 клетките с конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 чрез флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC (x10)**

За да докажем ефективността на полученият конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 допълнително са анализирани чрез EasyCounter BC още пет аферезни проби (APH) за определяне на общ брой CD34 клетки, взети от УМБАЛ „Св. Марина“–гр. Варна. Същите проби са изследвани в лабораторията по клинична хематология към УМБАЛ „Св. Марина“ където е използван комерсиален конюгат (анти-CD34антитяло–PE).

**Таблица 1. Сравнение на броя на CD34 клетки получен с конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 и с комерсиалния конюгат анти-CD34 антитяло-PE, използван при рутинни анализи**

<i>APH проби</i>	<i>анти-CD34антитяло–dR110 (EasyCounter BC) cells/mL</i>	<i>анти-CD34антитяло–PE (Поточен цитометър BD FACSCanto II – УМБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна) cells/mL</i>
<b>1</b>	697	737
<b>2</b>	814	825
<b>3</b>	357	390
<b>4</b>	402	434
<b>5</b>	196	205

От таблица 1 се вижда, че и с двата конюгата, както и с двата вида инструменти се получават сравними резултати. Тези данни убедително показват, че полученият конюгат анти-CD34антитяло–dR110 може успешно да се използва за определяне броя на стволовите клетки.

### **3. Получаване и пречистване на флуоресцентни конюгати на анти-CD45 антитяло**

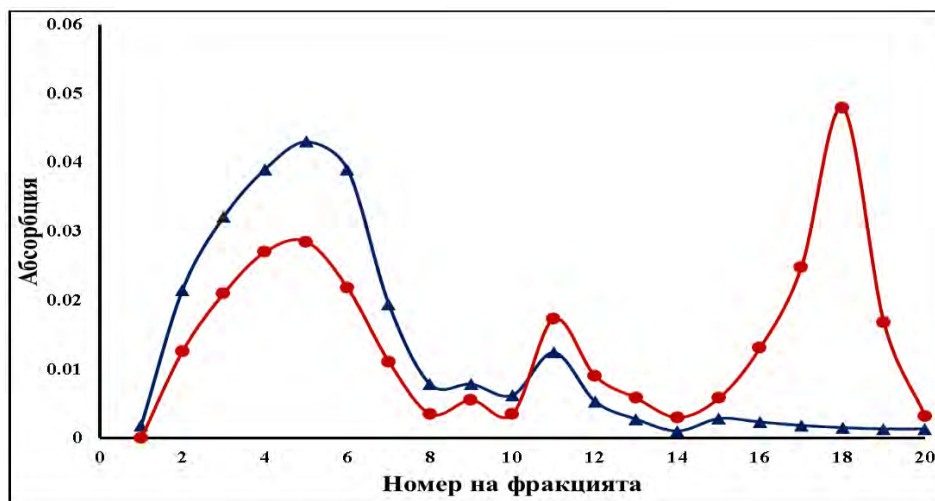
#### **3.1. Получаване и пречистване на флуоресцентен конюгат анти - CD45антитяло–ATTO465**

Определянето на броя на левкоцитите в периферна кръв и в аферезни проби е важна характеристика при преброяването на стволови клетки. Счита се, че чрез определяне на техния брой може да се предскаже броят на стволовите клетки в кръвните проби. Затова съвременните анализи на CD34

клетките са съчетани и с определяне броя на левкоцитите. Във връзка с това е синтезиран флуоресцентен конюгат анти-CD45антитяло–АТТО465. За получаването на конюгата е използвано моноклонално мише анти-CD45 антитялото, клон МЕМ-28 и флуоресцентно багрило АТТО465 NHS. АТТО багрилата покриват спектралната област от 350 nm в ултравиолетовата (UV) до 750 nm в близката инфрачервена (NIR) област на спектъра. Най-често използваните аминореактивни производни на АТТО багрилата са N-хидрокси-сукцинимидилови (NHS)-естери. NHS-естерите лесно реагират със съединения, съдържащи аминогрупи. За да реагира аминогрупата на антитялото, е необходимо тя да бъде в непротонирана форма. Следователно рН на разтвора трябва да се регулира, за да се получи висока концентрация на непротонирани аминогрупи. От друга страна, NHS-естерът също реагира с хидроксилните йони в разтвора, за да се получи „свободно“ багрило, което вече не реагира с аминогрупите на антитялото. Тъй като с увеличаване концентрацията на хидроксилни йони в разтвора, скоростта на тази неизбежна хидролиза на NHS-естерът се увеличава, рН трябва да се поддържа възможно най-ниско. Установено е, че буферирането на разтвора при рН 8.3 се оказва добър компромис между противоречивите изисквания. Амино групите на моноклоналното анти-CD45 антитяло се свързват с NHS-естерните групи на флуоресцентното багрило АТТО465 NHS, при което се образуват амидни връзки. След свързването на двата компонента, конюгатът се пречиства от нереагиралите вещества чрез молекулно-ситова хроматография. Използва се колона с пълнеж Sephadex G25 Medium. Измерва се абсорбцията на получените фракции при 280 nm (характерен абсорбционен максимум за антитялото) и при 453 nm (характерен абсорбционен максимум за АТТО465).

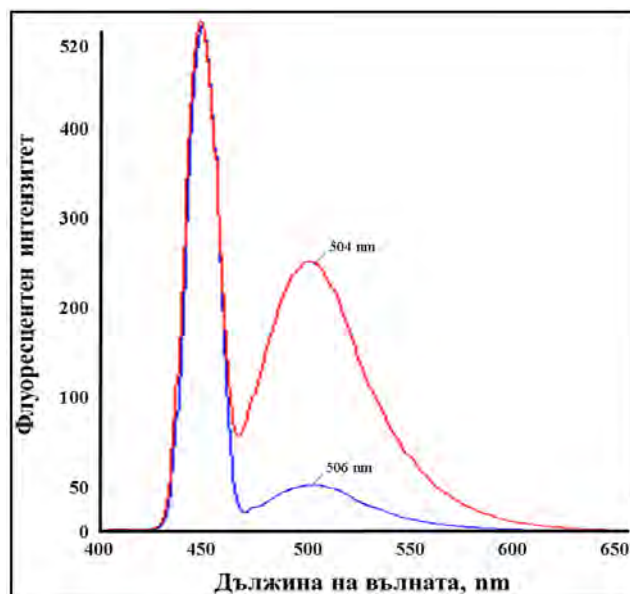
В сравнение с останалите компоненти на реакционната смес, полученият конюгат е с най-голяма молекулна маса, затова се открива в първия пик на

графиката (фиг. 10.). Чрез получените резултати от максималната абсорбция на първите два пика са изчислени: концентрация на IgG (анти-CD45 антитяло) и на багрилото в конюгата, и съотношение АТТО465/антитяло (F/P). Определено е, че конюгатът съдържа IgG 37,3  $\mu\text{g/mL}$  и F/P 3.59. Резултатите са показателни за качеството на получения конюгат и неговите флуоресцентни свойства, тъй като се счита, че оптималното съотношение F/P е в интервала 1 – 10.



**Фиг. 10. Гел-филтрационна хроматограма на конюгата анти-CD45 антитяло–АТТО465. Абсорбция при 280 nm (▲) и 453 nm (●)**

Изследвани са и емисионните (флуоресцентните) свойства на конюгата анти-CD45антитяло–АТТО465. Направено е сравнение на емисионните спектри на конюгата и несвързаното флуоресцентно багрило АТТО465 (фиг. 11.). От фигурата се вижда, че АТТО465 има емисионен максимум при 506 nm, а конюгатът антитяло–АТТО465 при 504 nm. Това изместване се дължи на свързването на багрилото с антитялото. Изявяването на конюгата при посочената дължина на вълната показва, че левкоцитите ще се оцветяват със зелен цвят.



**Фиг. 11. Флуоресцентни спектри на конюгата анти-CD45антитяло–ATTO465 (червен) и флуоресцентното багрило ATTO465 (син)**

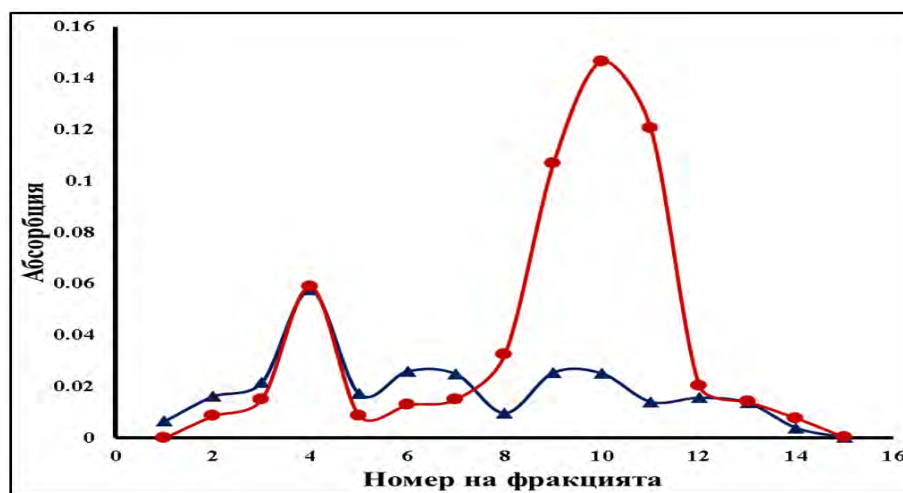
За да може да се проведе едновременен анализ на CD34 и CD45 клетките в една и съща кръвна проба е необходимо двата съответни конюгата да са маркирани с различни флуоресцентни багрила, осигуряващи различно оцветяване на клетките. За целта е синтезиран конюгат анти-CD45антитяло–ATTO620, който ще осигури червено оцветяване на левкоцитите.

### **3.2. Получаване и пречистване на флуоресцентен конюгат анти - CD45 антитяло–ATTO620**

ATTO 620NHS принадлежи към ново поколение флуоресцентни багрила в червената спектрална област. Специфичните характеристики на багрилото са: силно поглъщане, флуоресценция независима от рН, висока термична и фотостабилност. NHS-естерът на багрилото реагира лесно с аминокгрупи на протеини и други биомолекули. Както при всички NHS-

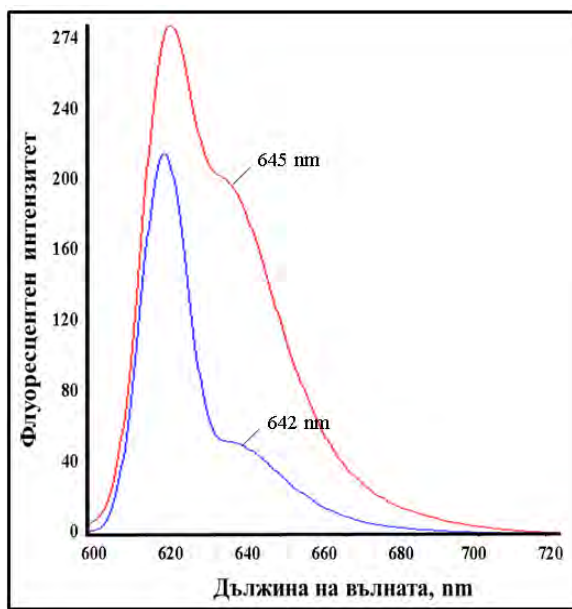
естери, конюгирането се осъществява при рН 8.3 по методика описана в материали и методи в дисертацията.

При получаване на конюгата, ключова стъпка е неговото пречистване. На фигура 12 е представена хроматограма от гелна филтрация (Sephadex G25 Medium) на получения конюгат анти-CD45антитяло–АТТО 620. Конюгатът се намира във фракция 4, излишъкът от антитяло се елуира като фракция 6, а излишакът от флуоресцентно багрило във фракциите от 8 до 12. Абсорбциите на всяка фракция се измерват с UV-Vis спектрофотометър при 280 и 620 nm. Установено е, че конюгатът съдържа 40,65 µg/mL IgG и съотношението F/P е 1,94.



**Фиг. 12. Гел-филтрационна хроматограма на конюгата анти-CD45антитяло–АТТО 620. Абсорбция при 280 nm (▲) и 620 nm (●)**

Пречистеният конюгат анти-CD45антитяло–АТТО 620 се подлага и на флуоресцентен анализ (фиг. 13.). Забелязва се, че пикът на конюгата запазва формата присъща на несвързаното АТТО 620, но се наблюдава изместване на емисионния максимум от 642 nm до 645 nm.



**Фиг. 13. Флуоресцентни спектри на конюгат анти - CD45  
антитяло–АТТО 620 (червено) и АТТО 620 (синьо)**

След получаването на флуоресцентните конюгати на анти-CD45 антитяло се пристъпва към доказване на тяхната активност към левкоцити.

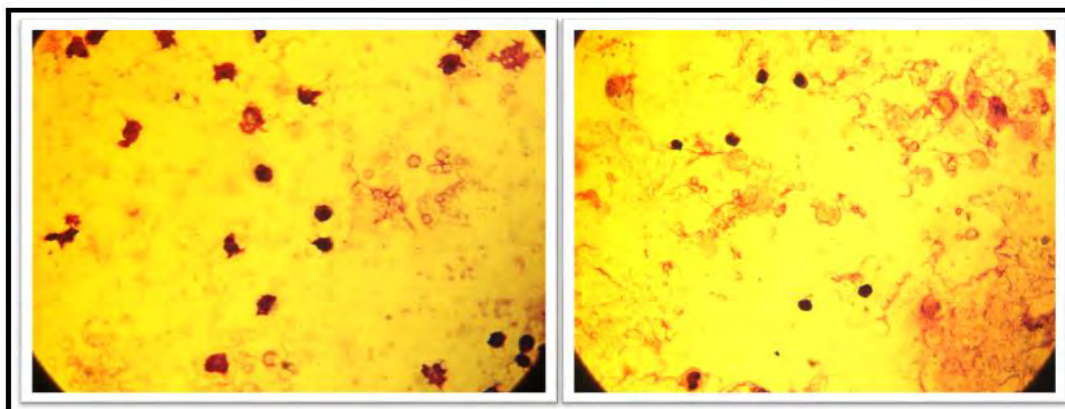
#### **4. Доказване активността на флуоресцентните конюгати на анти-CD45 антитяло към левкоцити (CD45 клетки)**

За доказване активността на синтезираните конюгати на анти-CD45 антитялото, първо са изолирани левкоцити от кръв на здрав пациент. За целта е използван реагент за разделяне на кръвни клетки - Ficoll-Paque PREMIUM (Ficoll). Той съдържа синтетичен високо-молекулен (Мм 400 000) полимер на захароза и епихлорхидрин (Ficoll PM400), натриев диатризоат и ЕДТА. Молекулите на полимера са силно разклонени и с високо съдържание на хидроксилни (-ОН) групи, което му осигурява добра разтворимост във водни разтвори. Натриевият диатризоат (Мм 635.92) е натриева сол на 3,5-диацетоамидо-2,4,6-трийодобензоена киселина. Функцията на натриевия диатризоат е да осигури оптимална плътност и осмоларитет, необходими за



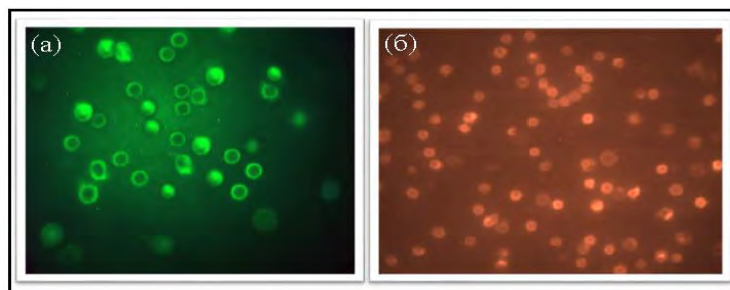
разделяне на кръвните клетки. ЕДТА е хелатен агент за свързване на тежките метали в кръвта. Тези три компонента, съчетани в един разтвор Ficoll-Raque PREMIUM както и прилагането на центрофугиране, осигуряват градиент на плътността, вследствие на което успешно се разделят кръвните клетки и се запазват неповредени.

При директно разделяне на клетките с Ficoll, се получават четири ясно обособени слоя. Първият (горен) слой е плазмата, след него са разположени мононуклеарните клетки, след това е Ficoll, а на дъното са гранулоцитите и еритроцитите. След лизис на еритроцитите остават гранулоцитите. Клетките от мононуклеарния слой и тези от гранулоцитния слой се анализират микроскопски чрез оцветяването им с багрилата Giemsa и Eosin-Methylene blue (фиг. 14.). Характерно за гранулоцитите е, че са с размер 15 – 20  $\mu\text{m}$  и съдържат сегментирано ядро (фиг. 14-ляво). Изолираните кръвни мононуклеарни клетки имат по-малък размер (5 – 10  $\mu\text{m}$ ) от гранулоцитите. Мононуклеарните клетки се идентифицират по тяхната кръгла форма и типичното им ядро, което почти изпълва клетката, оставяйки тънък пръстен от цитоплазма (фиг. 14-дясно).

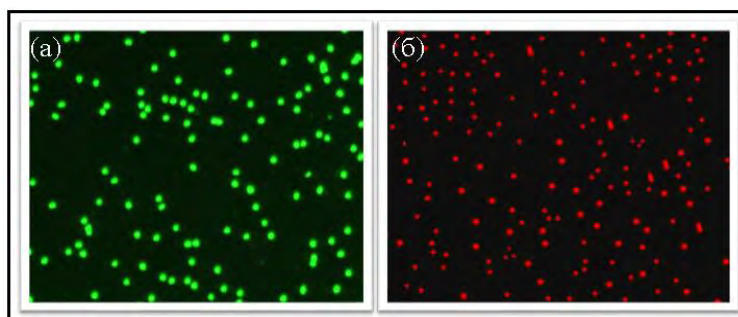


**Фиг. 14. Гранулоцити (ляво) и мононуклеарни клетки (дясно) от кръв, оцветени с Giemsa и Eosin-Methylene blue**

Така изолираните гранулоцити и мононуклеарни клетки се смесват (получават се чисти левкоцити) и се използват за доказване на активността на получените флуоресцентни конюгати на анти-CD45антитяло–АТТО465 и анти-CD45 антитяло–АТТО620 към левкоцити (CD45 клетки). На фиг. 15 са визуализирани CD45 клетките с двата флуоресцентни конюгата при използването на флуоресцентен микроскоп Olympus. Конюгираното анти-CD45 антитяло с АТТО465 и АТТО620 се свързва с епитопи, лежащи на повърхността на CD45 клетките и те флуоресцират в зелен или в червен цвят в зависимост от използвания флуоресцентен маркер. На фиг. 16 са представени флуоресцентните изображения на оцветените левкоцити с двата конюгата, но наблюдавани с автоматичния образен цитометър EasyCounter BC. При сравняване на изображенията на клетките на фиг. 15 и фиг. 16 се вижда, че по-ясни са изображенията на клетките при използването на автоматичния образен цитометър, докато при използването на флуоресцентния микроскоп е налице флуоресцентен фон. Очевидно е, че и двата конюгата са активни и добре визуализират CD45 клетките. За по-нататъшните експерименти се предпочита конюгата анти-CD45антитяло–АТТО620, тъй като той оцветява клетките в червен цвят. За осъществяване на едновременно определяне на CD34 и CD45 клетки в една и съща проба е необходимо двата специфични конюгата да имат различни по цвят маркери. И тъй като маркера при CD34 е със зелен цвят, за по-нататъшните експерименти подбираме конюгата с червен маркер.



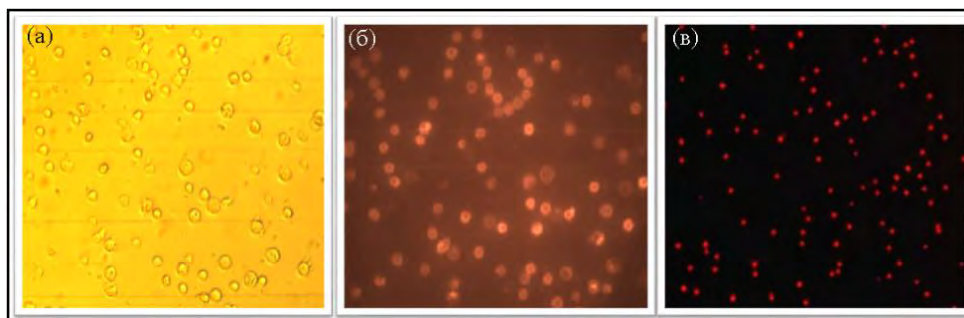
**Фиг. 15. Имунофлуоресцентен микроскопски анализ на CD45 клетки с анти-CD45 антитяло – ATTO465 (а); с анти- CD45 антитяло – ATTO620 (б), с флуоресцентен микроскоп Olympus**



**Фиг. 16. Имунофлуоресцентен анализ на CD45 клетки с конюгати на анти- CD45 антитяло–ATTO465 (а); с анти- CD45 антитяло–ATTO620 (б) с автоматичен образен цитометър „EasyCounter BC“**

На така предпочетеният конюгат анти-CD45антитяло–ATTO620 е определена активността спрямо левкоцити от аферезна проба. На фиг. 17 а и б са представени светлинните и флуоресцентни изображения на левкоцити в аферезна проба наблюдавани с микроскоп „Olympus“. Установено е, че има пълно идентично съответствие между левкоцитите на светлото поле (фиг. 17а) и на флуоресцентно наблюдаваното поле (фиг.17б) с микроскопа. Това съответствие убедително показва, че конюгатът анти-CD45антитяло–ATTO620 е активен, свързва се с всички налични CD45клетки и с успех може да се използва за определяне броя на CD45 клетки в кръвни проби. Същата

проба е анализирана с конюгата анти-CD45антитяло–АТТ0620 при използването на флуоресцентния образен цитометър EasyCounter BC. От (Фигура 17 в) се вижда, че флуоресцентните изображения на клетките са много ясни и няма фоново замърсяване.



**Фиг. 17.Светлинни изображения (а) и флуоресцентни изображения (б) на CD 45 клетки с конюгат анти CD45 антитяло–АТТ0620 от микроскоп „Olympus“ (x40); Флуоресцентно изображение (в) на CD45 клетки с конюгат анти-CD45 антитяло–АТТ0620 с флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC (x 10)**

За да докажем ефективността на полученият конюгат анти-CD45 антитяло–АТТ0620 допълнително е определен общия брой CD45 клетки чрез EasyCounter BC в пет аферезни проби (APH) взети от УМБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна. Същите проби са изследвани в лабораторията по клинична хематология към УМБАЛ „Св. Марина“ където е използван комерсиален конюгат (анти-CD45антитяло–FITC).

**Таблица 2. Сравнение на броя на CD45 клетки получен с конюгат анти-CD45 антитяло–АТТ0620 и с комерсиалния конюгат анти-CD45 антитяло–FITC, използван при рутинни анализи**

<i>APH проби</i>	<i>EasyCounter BC (cells/μL)</i>	<i>Поточен цитометър BD FACSCanto II – УМБАЛ „Св. Марина“ - гр. Варна (cells/μL)</i>
	<i>Анти-CD45 антитяло– АТТ0620 Клон MEM-28</i>	<i>Анти-CD45 антитяло– FITC Клон 2D1</i>
<b>1</b>	53 455	54 000
<b>2</b>	75433	77 500
<b>3</b>	91 388	87 500
<b>4</b>	59 137	64 328
<b>5</b>	75 822	76 324

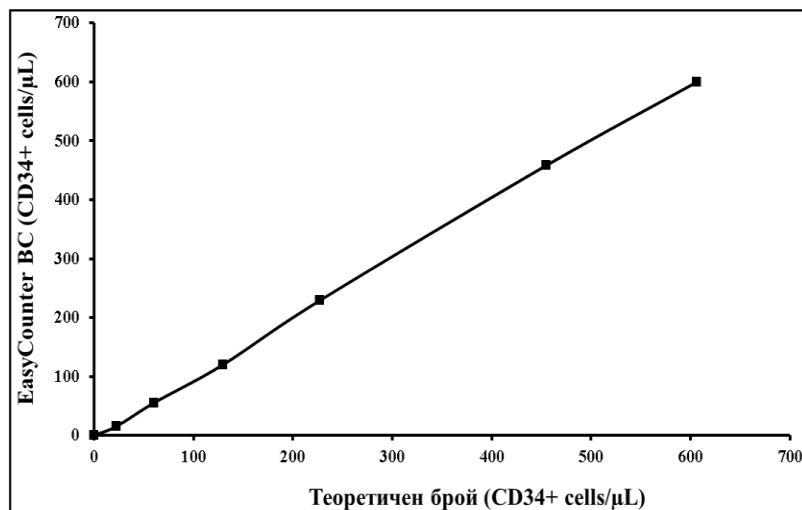
От таблица 2 се вижда, че и с двата конюгата, както и с двата вида инструменти се получават сравними резултати. Тези данни убедително показват, че полученият конюгат анти-CD45антитяло–АТТ0620 може успешно да се използва за определяне броя на CD45 клетки в кръвни проби.

### **5. Определяне на линейният интервал и възпроизводимостта на анализа на CD34 клетки с EasyCounter BC**

Извършено е индивидуално определяне на броя на стволовите клетки чрез автоматичен брояч EasyCounter BC. Броят на стволовите клетки е значително по-нисък от броя на левкоцитите. Средният брой на стволовите клетки в мобилизираната РВ е 0,03% (10,67 cells/μL), а в пробите за афереза

0,15% (около 233,69 cells/ $\mu$ L). Средният общ брой на левкоцитите в РВ е 35563 cells/ $\mu$ L, а в пробите за афереза 155794 cells/ $\mu$ L. Поради факта, че броят на стволовите клетки е много малък, за да се гарантира точността на анализа е важно да се определи линейният интервал и възпроизводимостта на тяхното измерване с апарата EasyCounter BC. За тази цел аферезна проба с висока концентрация на стволови клетки (910 cells/ $\mu$ L, измерена с поточен цитометър BD FACSCanto II в УМБАЛ „Св. Марина“ - гр. Варна) се разрежда и се приготвят разтвори с различни концентрации на стволови клетки (CD34 клетки). Изчислените стойности на концентрации на стволови клетки след разреждането са: 22,75; 60,66; 130,00; 227,50; 455,00; 606,66; 827,27. Определя се общия брой CD34 клетки във всички разредени проби като към аферезната проба се добавя конюгат CD34антитяло–dR110 и се използва EasyCounter BC. Към същите проби след това се добавя и ДНК флуоресцентно багрило (PO-TEDM 1) за определяне броя на мъртвите CD34 клетки. По разликата между общ брой CD34 клетки и брой мъртви клетки се определя броя на живите CD34+ клетки. PO-TEDM-1 е синьо флуоресцентно ядрено багрило от асиметричната монометинцианинова група с ниска фонова флуоресценция, висока флуоресцентна интензивност при свързване с ДНК и бърза ДНК кинетика на свързване. Това багрило не е пропускливо за живи клетки и може да проникне до ядрото само през компрометирана клетъчна мембрана (мъртви клетки). PO-TEDM-1 е синтезирано в нашата лаборатория по методика описана в предишна публикация. Екстинкционният максимум на PO-TEDM-1 е 430 nm, а емисионния – 450nm. Всяка разредена проба се анализира четири пъти (x 4 канала). На фиг. 37 е представена връзката между броя на теоретичните и измерените стволови клетки. Установено е, че линейният диапазон за измерване на CD34+ клетки с автоматичен брояч

EasyCounter BC е между 22,75 и 606,66 cells/ $\mu$ L и в този диапазон на разреждане линейността е задоволителна ( $R^2 = 0.99$ ) (фиг. 18.).



**Фиг.18. Линейност между теоретичния брой на CD34+ клетки и определения брой CD34+ клетки в серийно разредени проби чрез EasyCounter BC**

Изчислени са стандартните отклонения (SD) и коефициентите на вариация (CV) на получените резултати (таблица 3). Коефициентите на вариация се изчисляват по следната формула: [стандартно отклонение (SD)/средна стойност]  $\times$  100 (%).

**Таблица 3. Стандартни отклонения и коефициенти на вариация на резултатите за среден брой CD34+ клетки в линейния диапазон на измерване**

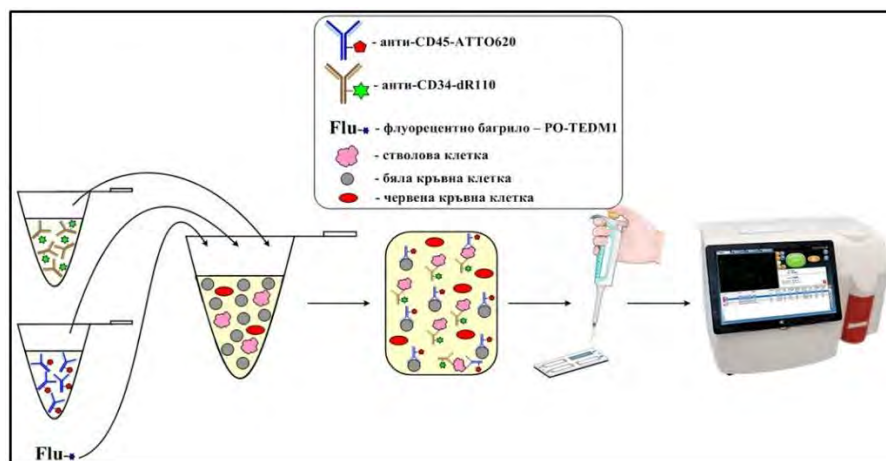
<b>Номер на разредената проба</b>	<b>Изчислен брой CD34+(cells/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Определен среден брой CD34+(cells/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Стандартно отклонение, SD</b>	<b>CV,%</b>
<b>1</b>	22,75	15,50	$\pm 1,52$	9,85
<b>2</b>	60,66	55,52	$\pm 5,17$	9,32
<b>3</b>	130,00	120,23	$\pm 8,93$	6,87
<b>4</b>	227,50	229,42	$\pm 13,10$	5,76
<b>5</b>	455,00	458,22	$\pm 31,21$	6,86
<b>6</b>	606,66	600,12	$\pm 47,68$	7,86

От таблица 3 се вижда, че коефициентите на вариация се движат в интервала от 5,76 до 9,85%. Прието е, че за рутинно клинично приложение на изброяване на CD34+ клетки, възпроизводимостта да е приемлива до 10% от средната стойност между измерваните проби. При направените експерименти се вижда, че коефициентите на вариация за CD34+ клетките са в приемливия диапазон. Следователно, апаратът EasyCounter BC за изброяване на CD34 клетки показва отлични аналитични показатели, включително прецизност и линейност.



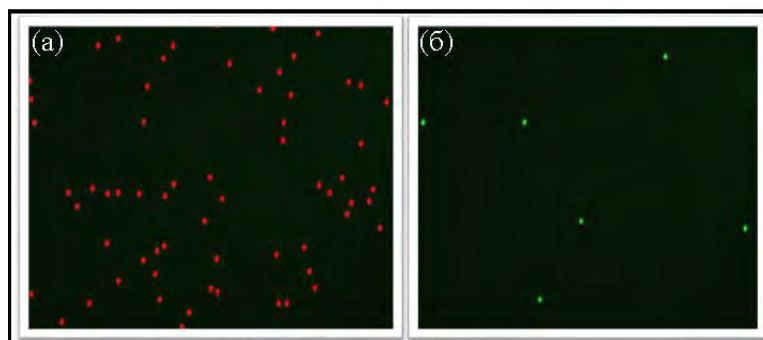
## **6. Имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне броя на CD34+ клетки и CD45+ клетки чрез автоматичен образен цитометър EasyCounter BC**

За да бъде успешна една трансплантация, броят на стволовите клетки, които трябва да се вляят, за да се постигне правилно хемопоетично възстановяване, според Lemos и колеги (2018), трябва да е минимум  $2-5 \times 10^6$  CD34+ жизнени клетки / kg телесно тегло. След като бъдат събрани, пресните HSC са жизнеспособни от няколко часа до 2 дни. Именно за това аферезните проби се криоконсервират и това значително удължава срока им на годност. Но размразяването на HSCs води най-вече до намаляване на жизнеспособността на клетките. Поради тази причина е необходимо да се извършва аналитично наблюдение на жизнеспособността на стволовите клетки в аферезните проби преди трансплантацията. Едновременно с преброяването на стволовите клетки (CD34 клетки) се извършва и броене на CD45 клетките в аферезните проби. За да се осъществи едновременното определяне на CD34 и CD45 клетки в една и съща проба са използвани двата синтезирани конюгати, описани по-горе: анти-CD34антитяло–dR110 и анти-CD45антитяло–ATTO620. Принципната схема за провеждане на едновременното преброяване на CD34+ клетки и CD45+ клетки в една и съща проба е представена на фиг. 19.



**Фиг. 19. Принципна схема за провеждане на едновременно преброяване на CD34+ и CD45+ клетки в кръвни проби с флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC**

Към размразените криоконсервирани аферезни проби се добавят двата конюгата: анти-CD34антитяло–dR110 и анти-CD45антитяло–АТТО620. Сместа се инкубира в продължение на 20 минути при 2 - 4 °С. Към същата проба след това се добавя и ДНК флуоресцентно багрило (РО-ТЕDM1) за определяне броя на мъртвите CD34 и CD45 клетки. Цялата смес се разрежда три пъти с буфер DPBS и се разбърква внимателно върху Mini Vortex. Отпипетират се по 8  $\mu$ L от пробата и се зареждат във всеки от четирите канала на клетъчния чип на EasyCounter BC. Всеки канал има 16 наблюдавани полета. Броят на каналите е четири, по този начин общите наблюдавани полета са 64. Чрез софтуерна програма се изчислява средния брой на клетките от 64-те наблюдавани полета. На екрана на апарата EasyCounter BC се визуализират зелено оцветени и червено оцветени клетки, съответстващи на общия брой CD34 клетки и съответно на общия брой CD45 клетки (фиг. 20 а,б). На фигурата са представени флуоресцентните изображения на CD45 (а) и CD34 (б) клетки в аферезна проба 1 (една от 6 анализирани аферезни проби).



**Фиг. 20. Флуоресцентни изображения на CD45 (а) и CD34 (б) клетки в аферзна проба 1, получени чрез EasyCounter BC**

Резултатите от мъртвите CD34 и CD45 клетки също се визуализират синьо оцветени, но техният брой е много малък и затова не са показани. Този незначителен брой мъртви клетки показва, че условията на съхранение на криоконсервираните аферзни проби са добри. В случая срокът на съхранение на измерваната проба 1 е 5 месеца. Чрез специалния алгоритъм на софтуера на апарата се извършват изчисления и резултатите са автоматично представени на дисплея на устройството. Определя се общ брой CD34 клетки (tCD34); брой мъртви CD34 клетки; брой CD34+ клетки; общ брой CD45 клетки (tCD45); брой мъртви CD45 клетки и брой CD45+ клетки. Всяка проба се анализирана четири пъти (x 4 канала). Броят на CD34+ и CD45+ клетки са определени като разлика между общия брой на клетките и броя на мъртви клетки. Жизнеспособността (viability) на CD34 клетките се изчислява като съотношение на броя на CD34+ клетки към общия брой CD34 клетки, в проценти. Жизнеспособността на CD45 клетките се изчислява като съотношение на броя на CD45+ клетки към общия брой CD45 клетки, в проценти.

След това останалите пет аферезни проби се анализират като се следва същата процедура. Получените резултати за изследваните шест проби от афереза са представени на таблица 4.

**Таблица 4. Брой на CD34+ и CD45+ клетки в аферезни проби, получени чрез EasyCounter BC**

<b>Проба</b>	<b>CD45+, cells/<math>\mu</math>L</b>		<b>CD34+, cells/<math>\mu</math>L</b>		<b>CD34/CD45, %</b>		<b>Жизнеспособност на CD34+клетки, %</b>	
	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV, %</b>	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV, %</b>	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV, %</b>	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV, %</b>
<b>1</b>	53 455 $\pm$ 2 191	4,1	117,60 $\pm$ 9,99	8,5	0,22 $\pm$ 0,02	9,5	99,10 $\pm$ 0,94	0,95
<b>2</b>	75 433 $\pm$ 4 903	6,5	414,88 $\pm$ 31,11	7,5	0,55 $\pm$ 0,04	7,2	99,12 $\pm$ 0,96	0,97
<b>3</b>	91 388 $\pm$ 5 579	7,2	438,66 $\pm$ 31,14	7,1	0,48 $\pm$ 0,04	8,7	99,05 $\pm$ 0,93	0,94
<b>4</b>	59 137 $\pm$ 3 016	5,1	206,98 $\pm$ 16,97	8,2	0,35 $\pm$ 0,03	9,2	99,32 $\pm$ 0,88	0,89
<b>5</b>	75 822 $\pm$ 4 777	6,3	492,84 $\pm$ 33,51	6,8	0,65 $\pm$ 0,05	7,0	98,84 $\pm$ 1,48	1,50
<b>6</b>	77 384 $\pm$ 4 643	6,0	301,80 $\pm$ 22,94	7,6	0,39 $\pm$ 0,03	8,9	99,15 $\pm$ 0,87	0,88

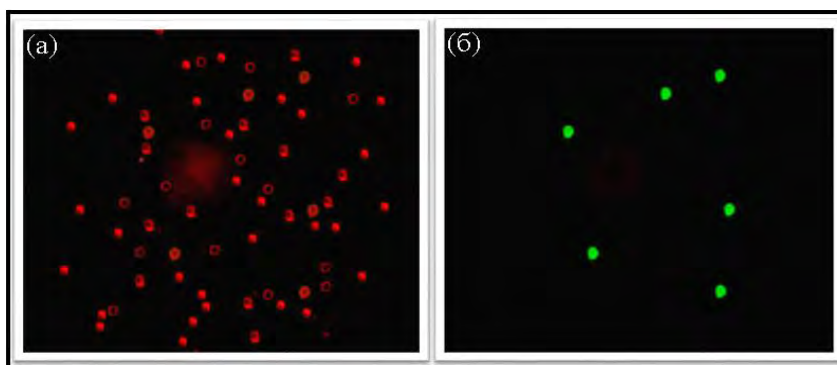
Броят на CD45+ варира от 53455 до 91 388 cells/ $\mu$ L, а броят на CD34+ варира от 117,60 до 492,84 cells/ $\mu$ L. Стойностите на CD34-положителната жизнеспособност на клетките са високи от 98,84 до 99,32%. Коефициентите на вариация (CV) на резултатите за CD34 + клетки варират от 6.8 до 8.5%, а тези за CD45+ варират от 4.1 до 7.2% (Таблица 4). Коефициентите на вариация са в рамките на допустимите нива  $\leq 10\%$  за рутинни клинични изследвания. Независимо, че експериментите са осъществени с аферезни проби, разработвания метод с EasyCounter BC може да бъде приложен и за

мобилизирана периферна кръв (преминаване на стволови клетки от ВМ в периферната кръв, чрез използване на хемопоетични растежни фактори).

Известно е, че при анализ на мобилизирана периферна кръв с микроскоп и поточна цитометрия броят на червените кръвни клетки е много голям ( $4,0-5,0 \times 10^{12}$  cells/L) и това затруднява преброяването на CD34+, CD45+ клетките и мъртвите ядрени клетки. За да се премахне засенчването на клетките от червени кръвни клетки, обикновено клиничните проби се обработват предварително с еритроцитен лизиращ разтвор. Но тези методи не винаги са успешни за премахване на всички червени кръвни клетки и водят до значителни грешки при определяне концентрацията на целевите клетки. Освен това при извършване на тази стъпка е необходимо голямо разреждане на пробата, което допълнително усложнява микроскопското броене. Броят на червените кръвни клетки в аферезните проби е много нисък, тъй като те и плазмата са отделени предварително. Въпреки това, съгласно протоколите за преброяване на CD34 клетки в аферезни проби чрез оптичен микроскоп и поточен цитометър, също се използва еритроцитен лизисен буфер. Използвайки автоматичния брояч на флуоресцентни клетки EasyCounter BC, необходимостта от лизис на червените кръвни клетки се елиминира и концентрацията и жизнеспособността на CD34 и CD45 клетките в аферезни проби могат да бъдат измерени без тяхното отстраняване от пробата. Проведени са многократни експерименти с аферезни проби при използването на EasyCounter BC и е доказано, че наличието на остатъчни еритроцити не пречи на целевите анализи. Тези резултати са потвърдени и при определяне на броя на левкоцитите в периферна кръв в предишна публикация.

## 7. Сравнение на резултати получени от EasyCounter BC с тези получени от микроскоп Olympus и поточен цитометър Guava

Проведено е валидиране на разработения имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне броя на CD34+ клетки и CD45+ клетки чрез автоматичен образен цитометър EasyCounter BC. За целта анализирани по-горе шест аферезни проби с EasyCounter BC са изследвани с флуоресцентен микроскоп Olympus (Olympus BX 51, Япония – 40 -кратно увеличение). CD34 и CD45 клетките са оцветени със същите конюгати анти-CD34антитяло–dR110 и анти-CD45антитяло–АТТ0620. Ядрените клетки се оцветяват с ДНК флуоресцентно багрило PO-TEDM1. Фигура 21 а,б представя флуоресцентните изображения на CD45 и CD34 клетки от аферезна проба, използвайки микроскоп Olympus, а в таблица 6 са посочени данните за шестте анализирани аферезни проби – брой CD34+ , CD45+ клетки, SD и CV. CV на броя CD34+ клетки, определени с микроскоп Olympus, варират от 14,0 до 17,5%, а тези на броя CD45+ клетки варират от 14,0 до 18,0% (Таблица 5). Данните, получени от EasyCounter BC и от микроскопа Olympus са сравнени. Очевидно е, че CV на получените резултати от EasyCounter BC са по-малки от CV на получените резултати от микроскопа на Olympus. Следователно EasyCounter BC осигурява по-прецизни и възпроизводими резултати.



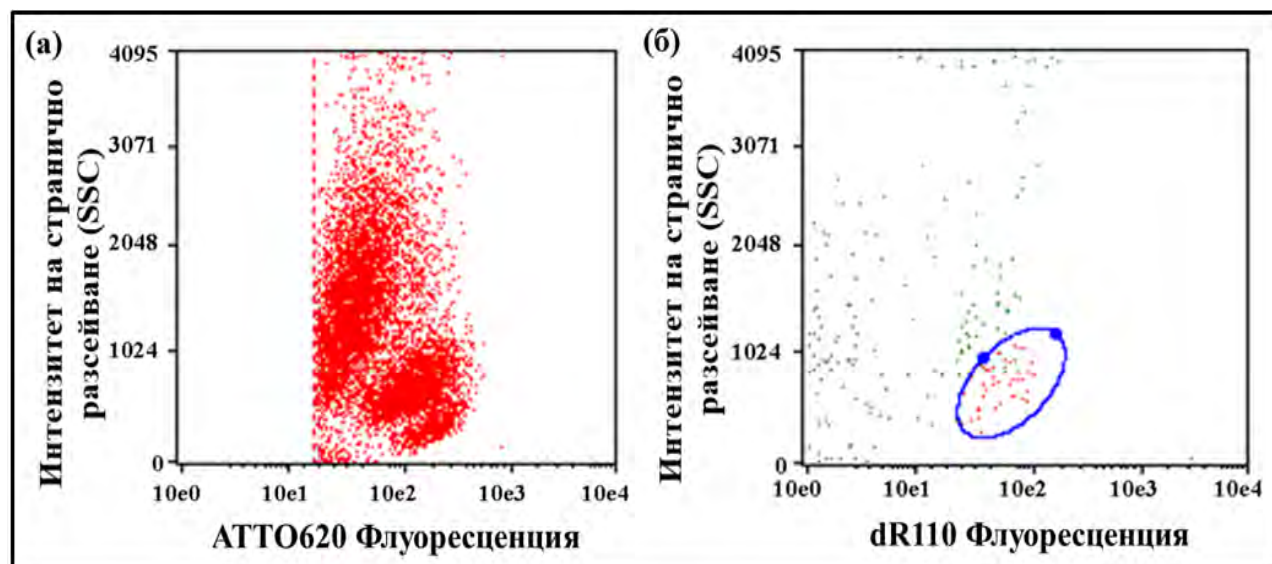
**Фиг. 21. Флуоресцентни изображения на CD45 (а) и CD34 (б) клетки в аферезна проба 1, получени чрез микроскоп Olympus**

**Таблица 5. Брой на CD34+ и CD45+ клетки в аферезни проби, определени чрез микроскоп Olympus**

<i>Проба</i>	<i>CD45+, cells/<math>\mu</math>L</i>		<i>CD34+, cells/<math>\mu</math>L</i>		<i>CD34/CD45, %</i>	
	<i>Средна стойност, SD</i>	<i>CV %</i>	<i>Средна стойност, SD</i>	<i>CV %</i>	<i>Средна стойност, SD</i>	<i>CV %</i>
<b>1</b>	48 426 $\pm$ 6 779	14,0	77,48 $\pm$ 10,84	14,0	0,16 $\pm$ 0,02	14,8
<b>2</b>	70 468 $\pm$ 10 922	15,5	324,15 $\pm$ 51,21	15,8	0,46 $\pm$ 0,06	13,5
<b>3</b>	77 745 $\pm$ 13 994	18,0	326,52 $\pm$ 57,14	17,5	0,42 $\pm$ 0,08	13,6
<b>4</b>	54 234 $\pm$ 9165	16,9	162,70 $\pm$ 24,07	14,8	0,30 $\pm$ 0,04	14,5
<b>5</b>	72 188 $\pm$ 11 911	16,5	411,47 $\pm$ 62,54	15,2	0,57 $\pm$ 0,07	13,1
<b>6</b>	69 458 $\pm$ 11 252	16,2	243,10 $\pm$ 36,22	14,9	0,35 $\pm$ 0,05	14,9

Валидирането на разработения метод е осъществено и чрез анализиране на същите шест проби чрез поточен цитометър Guava easyCyte™ 8HT. Първо, общият брой на ядрените клетки се определя с помощта на автоматизиран клетъчен брояч EasyCounter BC, използвайки лизисен реагент и багрило PO-TEDM 1. Лизисният реагент разрушава клетъчна мембрана на клетките, позволявайки на багрило PO-TEDM 1 да оцвети клетъчната ДНК. Съгласно препоръката за работа с поточна цитометрия, броят на клетките в пробата трябва да бъде по-нисък от  $5 \times 10^5$  cells/mL. Ако броят на ядрените клетки е висок, те се редуцират под  $5 \times 10^5$  cells/mL чрез добавяне на PBS, pH 7.4. След това към 50  $\mu$ L разредена аферезна проба се добавят конюгатите CD34антитяло–dR110 и CD45антитяло–ATTO620 и след 20 min инкубация се добавя ДНК флуоресцентното багрило (PO-TEDM 1) за определяне броя на мъртвите

клетки. Съгласно протокола за поточна цитометрия, лизисът на еритроцитите се извършва с помощта на разтвор на амониев хлорид. Първо се оптимизират параметрите на поточния цитометър Guava easyCyte™ 8HT. Използва се програмата Guava® Express Plus. Пробите се пропускат със средна скорост. Преброените събития за всеки анализ са 3 000. Уредът използва софтуер за анализ на данните. Фигура 22 представя флуоресцентно изображение на CD34+ и CD45+ клетки на аферезна проба с помощта на поточен цитометър Guava. На таблица 6 са отразени анализите на шестте аферезни проби, проведени с Guava easyCyte™ 8HT.



**Фиг. 22. Брой на CD45 клетки (a) и CD34 клетки (b) в аферезна проба 1 с използване на поточен цитометър Guava**



**Таблица 6. Брой на CD34+ и CD45+ клетки в аферезни проби, определени чрез поточен цитометър Guava**

<b>Проба</b>	<b>CD45, cells/<math>\mu</math>L</b>		<b>CD34+, cells/<math>\mu</math>L</b>		<b>CD34/CD45, %</b>	
	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV %</b>	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV %</b>	<b>Средна стойност, SD</b>	<b>CV %</b>
<b>1</b>	54 000 $\pm$ 2 700	5,0	108,00 $\pm$ 9,50	8,8	0,20 $\pm$ 0,02	9,8
<b>2</b>	77 500 $\pm$ 4 495	5,8	441,75 $\pm$ 30,92	7,0	0,57 $\pm$ 0,04	7,4
<b>3</b>	87 500 $\pm$ 7 000	8,0	428,75 $\pm$ 30,44	7,1	0,49 $\pm$ 0,04	8,9
<b>4</b>	64 328 $\pm$ 3 988	6,2	192,98 $\pm$ 15,82	8,2	0,34 $\pm$ 0,03	9,5
<b>5</b>	76 324 $\pm$ 4 655	6,1	519,00 $\pm$ 35,81	6,9	0,68 $\pm$ 0,05	8,0
<b>6</b>	76 792 $\pm$ 4 991	6,5	322,53 $\pm$ 24,83	7,7	0,42 $\pm$ 0,04	9,2

Данните, получени от EasyCounter BC и от поточния цитометър Guava също бяха сравнени. CV на броя на CD34+ клетки варира от 6,9 до 8,8%, а тези на броя на CD45 + клетките варират от 5,0 до 8,0% (Таблица 6). CV-тата са в рамките на допустимите нива  $\leq 10\%$ . Очевидно е, че CV на получените резултати от EasyCounter са подобни на CV на получените резултати чрез поточен цитометър.

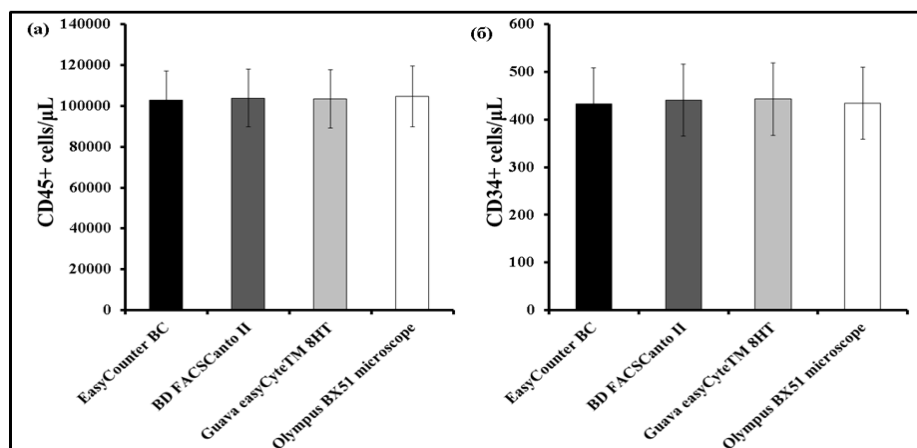
Установено е, че EasyCounter BC показва отлични аналитични характеристики прецизност, линейност и коефициенти на възпроизводимост. Сравнението на данните не показва значителни разлики между различните инструменти.

Ефективността на дългосрочното съхранение на използваните проби за афереза (5-8 месеца) е оценена чрез проследяване на броя на жизнеспособните CD34+, CD45+ клетки и на мъртви клетки, преди и след

криоконсервация за период 5-8 месеца. Установено е, че средните проценти на възстановяване на различните видове изследвани клетки са в интервала от 99,5 - 99,8%. Доказано е, че възстановяване на клетките след размразяване не се повлиява значително от периода на тяхното съхранение.

#### **8. Корелация между броя на CD34 и CD45 клетки измерени на EasyCounter и микроскопа Olympus; EasyCounter и поточен цитометър Guava**

Анализирани са 43 аферезни проби с двата флуоресцентни конюгата, получени в нашата лаборатория (анти-CD34антитяло-dR110 и анти-CD45 антитяло-АТТ0620) и багрилото РО-ТЕDM 1 за мъртви клетки, както и с новия флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC. Резултатите са сравнени с тези получени от поточен цитометър BD FACSCanto II в „Клинична лаборатория“, УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна, използвайки стандартен протокол и търговски BD кит за изброяване на стволови клетки, съдържащ флуоресцентни конюгати анти-CD34 антитяло-PE (клон 8G12, клас III) и анти-CD45антитяло-FITC (клон: 2D1). За оценка на жизнеспособността на клетките по стандартния протокол се използва 7-амино актиномицин D. Същите проби са анализирани с поточен цитометър Guava easyCyte TM 8HT и флуоресцентен микроскоп Olympus BX51 с помощта на синтезираните от нас конюгати. Направено е сравнение между четирите различни аналитични техники - автоматичен брояч на клетки EasyCounter BC; поточен цитометър BD FACSCanto II, поточен цитометър Guava easyCyte TM 8HT и флуоресцентен микроскоп Olympus BX51 (фиг. 23.). Установено е, че броят на CD45+ и CD34+ клетки, анализирани от различните конюгати и различните инструменти, не се различава значително.

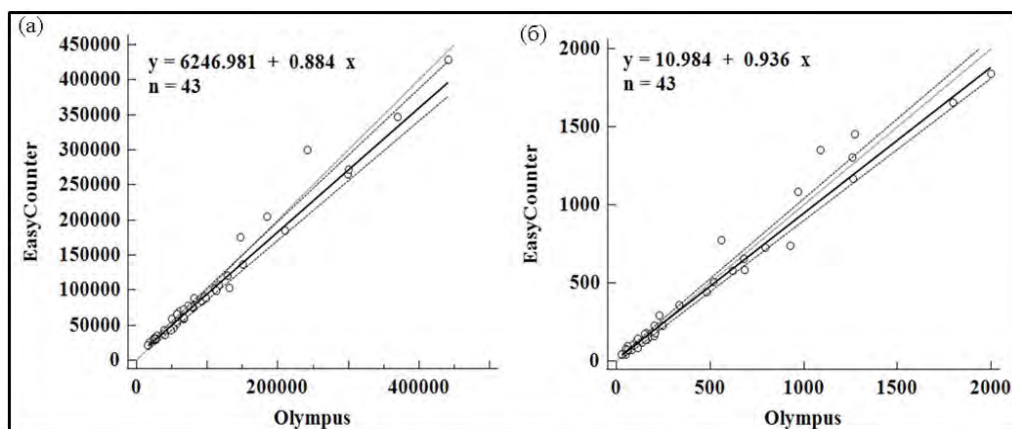


**Фиг. 23. Среден брой CD45+ (а) и CD34+ (б) клетки в аферезни проби, получени чрез четири техники - EasyCounter BC, BD FACSCanto II, Guava easyCyte™ 8HT, микроскоп Olympus BX51**

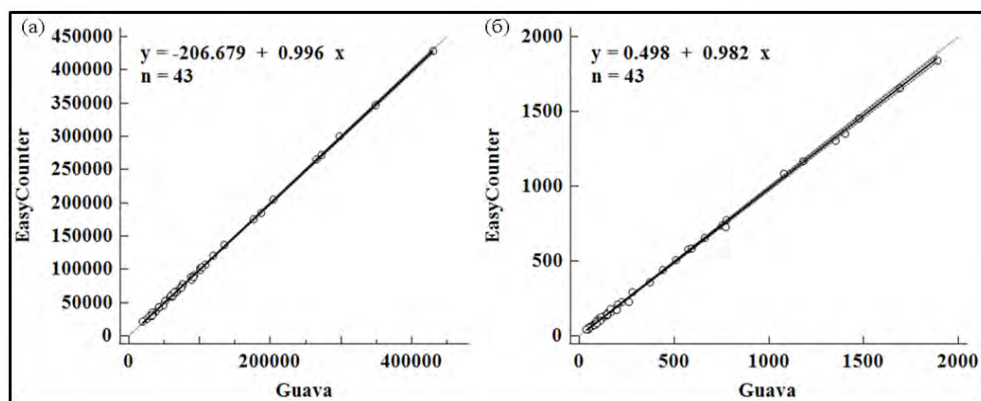
Определена е корелацията между резултатите от 43 аферезни проби, получени чрез EasyCounter BC, Olympus микроскоп и поточен цитометър Guava при използването на синтезираните от нас конюгати. Изчислени са корелациите на Пийрсън между трите методи. Корелацията между микроскопския метод, използващ Olympus и образно-цитометричния метод с EasyCounter BC е 0,987 за CD45+ клетки и 0,986 за CD34+ клетки. Сравнявайки метода с EasyCounter BC и поточната цитометрия, корелацията на Пийрсън и при двата типа клетки е 0,999. Следователно и трите метода имат достатъчно добра корелация.

С помощта на корелационния анализ на Спиърман е анализирана линейността и е изчислен коефициента на детерминация ( $R^2$ ). При сравняването на EasyCounter BC и микроскопа Olympus се получават следните стойности за  $R^2$  - 0.9747 за CD45+ и 0.9724 за CD34+, докато сравнението между EasyCounter BC и поточен цитометър Guava показва стойности  $R^2$  - 0.9998 за CD45+ и 0.9994 за CD34+. Регресионният анализ

разкрива добра връзка между EasyCounter BC и микроскопа Olympus (фиг. 24.). Коефициентите на корелация на Спирман за CD45+ и CD34+ между EasyCounter BC и микроскопа Olympus са съответно 0.987 и 0.982 (P <0.0001). По-добри резултати са получени между EasyCounter BC и поточен цитометър Guava, съответно 0,998 и 0,998 (P <0,0001), Фигура 25.



**Фиг. 24. Корелация между EasyCounter BC и микроскоп Olympus за CD45+ (a), CD34+ (b), показани чрез регресионен анализ Passing-Bablok. Данни от микроскопа на Olympus по хоризонталната ос (x). Данни от EasyCounter BC по вертикалната ос (y)**



**Фиг. 25. Корелация между EasyCounter BC и поточен цитометър Guava за CD45+ (a), CD34+ (b), показани чрез Passing – Bablok регресионен анализ. Данни от поточния цитометър по хоризонталната ос (x). Данни от EasyCounter BC по вертикалната ос (y)**

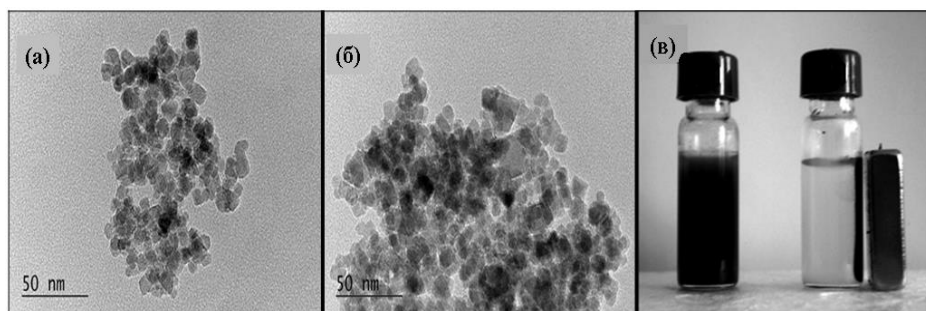
Сравнението на данните не показва значителни разлики между различните инструменти. Резултатите от EasyCounter BC са близки с резултатите както на микроскопа Olympus, така и на поточния цитометър Guava. По принцип рутинният клиничен тест за изброяване на клетки CD34 + трябва да притежава простота, висока чувствителност, точност, възпроизводимост и скорост. Флуоресцентният образен цитометър EasyCounter BC е просто и компактно устройство. Той осигурява точни, надеждни резултати и ниски коефициенти на вариация. За осъществяване на рутинен клиничен анализ, EasyCounter BC демонстрира отлично представяне по отношение на изброяване на CD34+ клетки в проби от РВ и левкафереза. Това устройство е технически лесно за използване. След инкубационната процедура на клетки с всички реагенти, измерванията се извършват в рамките на 3 минути.

## **II. Разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ с флуоресцентни конюгати на анти-CD 45 антитяло в свободна форма и на анти-CD 34 антитяло в имобилизирана форма**

### **1. Получаване на модифицирани МНЧ**

Един от важните компоненти на даден хетерогенен имуноанализ е носителят за имобилизация на антитялото. Голямата специфична повърхност на носителя, благоприятства степента на имобилизация на биоагента. В последните години за тази цел интензивно се използват частици с наноразмери. МНЧ намират голямо приложение, тъй като те позволяват лесно изпълняване на отделните етапи на анализа чрез сепариране при прилагане на магнитно поле.

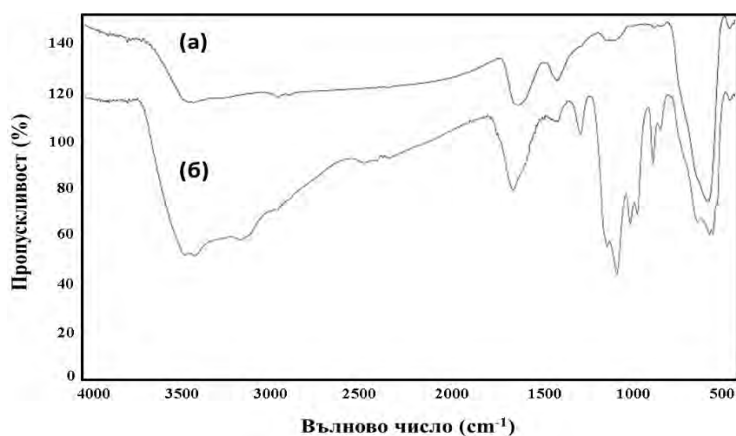
Като цяло процесът на прилагане на наноматериали съдържа четири основни стъпки: синтез и характеризиране на наночастици; модификация на повърхността на наночастиците за създаване на активни групи; конюгиране на модифицираните наночастици с определени биомолекули и изследване на биоактивността на получения конюгат. Получаването на МНЧ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) се извършва чрез термична копреципитация във воден разтвор, съдържащ  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  йони, при скорост на разбъркване 1500 rpm и рН 13,7, използвайки автоматичната система Syrris Globe Systems. Синтезираните МНЧ са плътни, черни и силно намагнитизиращи се под действието на магнитно поле. Те съдържат голям брой хидроксилни групи на повърхността си, които не са особено подходящи за ковалентна имобилизация на антитела. Затова МНЧ се подлагат на повърхностна модификация със силан (APTES), при което на повърхността им се въвеждат аминогрупи. Модификация на МНЧ с APTES се извършва в азотна атмосфера в система Syrris Globe (Англия) при 1000 rpm за 7h. Вследствие на тази модификация са въведени аминогрупи по повърхността на наночастиците. Определено е количеството на аминогрупите (0,029 mgqv/g МНЧ) чрез реагентите 2-иминотиолан (реагент на Traut) и 5,5'-дителибис- (2-нитробензоена киселина), (реагент на Ellman). Чрез ТЕМ анализ (JEM-1400 PLUS, USA) е определен средният размер на първоначално получените МНЧ (6,6 nm, Фиг. 26а) и модифицираните МНЧ (8,18 nm, Фиг. 26б). Модифицираните МНЧ запазват сферичната си форма, която е характерна за изходните  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  МНЧ.



**Фиг. 26. TEM анализ на (а) немодифицирани и (б) модифицирани МНЧ с APTES; (в) Хомогенен разтвор на МНЧ и отделени МНЧ чрез външен магнит**

Модифицираните МНЧ показват добра диспергираща способност в дейонизирана вода, поради високата повърхностна енергия и намаляването на биполярното привличане на МНЧ след модификация с функционални агенти, (фиг. 26 в). При прилагане на външен магнит магнитните частички лесно се сепарират (фиг. 26 в).

За да се потвърди модификацията на повърхността на МНЧ, немодифицираните и модифицирани магнитни наночастици са охарактеризирани чрез инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR спектрометър Tensor 27-Bruker, с разделителна способност до  $1\text{cm}^{-1}$ ). FTIR спектрите са представени на фиг. 27.



**Фиг. 27. FTIR спектър на а) МНЧ и б) МНЧ, покрити с APTES**

Доказателство за образуването на железни МНЧ са двете силни абсорбционни ивици при  $585\text{ cm}^{-1}$  (фиг. 27 а,б), които съответстват на връзката Fe-O в магнетита. Модификацията с APTES (спектър 27 б) се потвърждава от ивиците при  $1113$ ,  $1048$  и  $989\text{ cm}^{-1}$ , дължащи се на Si-O-H и Si-O-Si връзките. Абсорбционните ивици при  $922$  и  $862\text{ cm}^{-1}$  показват разтягането на Si-O-H и OH вибрациите върху повърхността на МНЧ. Двете широки ивици при  $3417$  и  $1625\text{ cm}^{-1}$  се дължат съответно на валентно трептене на връзката N-H и на свободните аминок групи на APTES. Освен това, N-свързаните силаноли абсорбират при около  $3200$  и  $3470\text{ cm}^{-1}$ .

## **2. Имобилизация на конюгата анти-CD34 антицяло-dR110 върху модифицираните МНЧ**

Конюгатът анти -CD34антицяло-dR110, описан по-горе се имобилизира към модифицираните МНЧ по карбодиимидния метод. EDC свързва свободните аминок групи на модифицираните магнитни наночастици със свободни карбоксилни групи от конюгата анти-CD34антицяло-dR110 (Wei и колектив, 2006), създавайки конюгационен комплекс (обозначен с МНЧ-анти-CD34). Последният излъчва зелена светлина, характерна за флуоресцентното багрило dR110, при възбуждане със светлина с дължина на вълната  $491\text{ nm}$ . Полученият имобилизиран конюгат се съхранява в  $10\text{ mM PBS}$  с рН  $7,4$ . Разтворът е хомогенен и стабилен във времето, тъй като размерът на наночастиците е много малък. Количеството протеин съдържащ се в имобилизирания конюгат се определя по метода на Брадфорд -  $25\text{ }\mu\text{g/mg MNP}$ . Аликвотна част от разтвора на имобилизирания конюгат се наблюдава на микроскоп Olympus (Фиг. 28.). На фигура 28 а (светло поле) ясно се вижда, че комплексите МНЧ-анти-CD34 (магнитните наночастици, свързани с конюгата) са равномерно разпределени в цялото поле като плътни точки.



Същите комплекси МНЧ-анти-CD34 са наблюдаван и под флуоресцентен микроскоп с дължина на облъчване 491 nm (фиг. 28 б). Установено е, че МНЧ - конюгат антитяло-багрило не флуоресцират, тъй като размерите на комплексите са много малки, както и концентрацията на локализирания конюгат е недостатъчна за да се забележи флуоресценция.

За да се докаже активността на получения комплекс, той се добавя към размразена аферезна проба. След свързването му с CD34+ рецепторите по повърхността на стволовите клетки, последните започват да флуоресцират и са лесно видими при наблюдение с микроскопа Olympus (фиг. 28 в). От фигура 28в може ясно да се забележи, че комплексите МНЧ-анти-CD34 се свързват с клетъчната повърхност и образува зелен флуоресцентен пръстен. Тъй като размерите на комплексите са много малки, вероятно към една стволова клетка се свързват няколко комплекса и поради тяхното концентриране на повърхността на клетката, тя се оцветява в зелен цвят (флуоресценцията става значима).



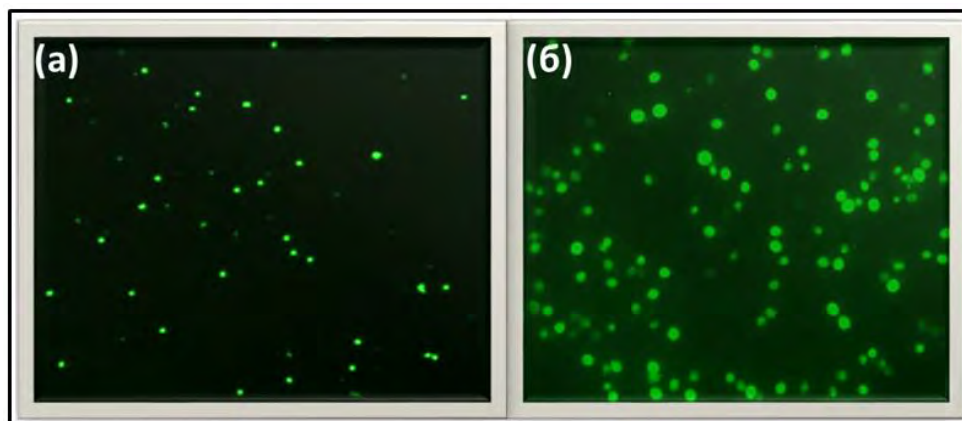
**Фиг. 28. (а) Светлинни изображения на комплекса МНЧ-анти-CD34 от микроскоп Olympus (x40); (б) Флуоресцентни изображения на комплекса МНЧ-анти-CD34 от микроскоп Olympus (x40); (в) Флуоресцентни изображения на стволови клетки свързани с комплекси МНЧ-анти-CD34, от микроскоп Olympus (x40)**

Очевидно е, че имобилизираният конюгат - анти-CD34антитяло–dR110 върху МНЧ може успешно да се използва за преброяване на стволови клетки (CD34 клетки). Освен това, този имобилизиран конюгат има едно основно предимство – с прилагането на външен магнит се предоставя възможност за изолиране и концентриране на свързаните стволови клетки. Това позволява тези клетки да бъдат отделени от левкоцитите и по този начин техния голям брой няма да пречи на преброяването на малкия брой стволови клетки. Възможността да бъдат концентрирани стволовите клетки ще осигури по-прецизно броене.

### **3. Имунофлуоресцентен анализ за броене на CD34 клетки в аферезни проби с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло–dR110 върху МНЧ с помощта на EasyCounter BC**

Осъществен е анализ за преброяване на CD34 клетки в аферезна проба с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло–dR110 върху МНЧ и новия флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC. Процедурите по анализа подробно са прецизирани, за да се обезпечи възпроизводимост на резултатите. Определено е оптималното количество на имобилизирания конюгат, който се добавя към 150  $\mu\text{L}$  аферезна проба - 5  $\mu\text{L}$  с концентрация 4,5 mg/mL. Целта е да се осъществи достатъчно количество селективно локализиране на наночастици върху клетъчната повърхност на CD34+ клетките при взаимодействието на анти-CD34 антитялото и клетъчния трансмембранен фосфоглюкопротеин. При прилагане на външен постоянен магнит, всички магнитни комплекси се придвижват към магнита, в резултат на което те се събират и изолират. Определено е и оптималното време за сепариране на МНЧ – 10 min. Изолираните магнитни комплекси се промиват два пъти с DPBS буфер и накрая се ресуспендират в малък обем от същия буфер, така че

концентрацията на стволовите клетки да е 5 пъти по-висока, отколкото в оригиналната проба. По този метод, левкоцитите са отстранени и те не пречат на броенето на стволовите клетки. Освен това, е възможно да се приложи различна степен на концентрация на магнитните комплекси, в зависимост от първоначалното количество на стволови клетки. Изолираните стволови клетки се преброяват с EasyCounter BC (фиг. 29а) и за сравнение с микроскоп Olympus (фиг. 29б). От фигурата се вижда, че визуализацията на комплексите: МНЧ-анти-CD34+ свързани със стволовите клетки и с двата апарата е много добра. Чрез автоматичният апарат на EasyCounter BC е определено, че в изследваната проба броят на стволовите клетки е малко по-висок (411 cells/ $\mu$ L), отколкото при втория - с микроскоп Olympus (345 cells/ $\mu$ L). Вероятната причина за това е факта, че броенето на клетки при микроскоп Olympus е субективно (не е автоматизирано).



**Фиг. 29. (а) Флуоресцентни изображения на стволови клетки с имобилизиран конюгат анти-CD34 антитяло-dR110 върху МНЧ, използвайки EasyCounter BC (x10); (б) Флуоресцентно изображение на стволови клетки с имобилизиран конюгат анти-CD34 антитяло-dR110 върху МНЧ, използвайки микроскоп Olympus (x40)**

С помощта на описания анализ и флуоресцентния образен цитометър „EasyCounter“ ВС са анализирани седем размразени аферезни проби и е определен броя на CD34+, CD45+ и мъртви клетки, поотделно. Мъртвите клетки в пробата, се определят чрез използването на ДНК багрилото Sofia Green. Багрилото е синтезирано в Милкотроник ЕООД. То е с висок квантов добив, няма фоново оцветяване, и има силен флуоресцентен интензитет при свързването на ДНК. Екстинкционният пик на Sofia Green е при 494 nm, а емисионния – при 518 nm. Клетките флуоресцират със зелен цвят. Аферезната проба се дели на две аликвотни части и трите анализа протичат поотделно. В първата част се определя общия броя на CD34+ клетки с помощта на имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло–dR110 върху МНЧ и външен магнит. В супернатантата отделена от първата проба се определя броят на CD45+ клетки с помощта на конюгата анти-CD45антитяло–АТТО620 и на мъртвите CD45 клетки с помощта на Sofia Green. Във втората аликвотна проба се определя общ брой мъртви клетки (CD34 и CD45 клетки) с помощта на ДНК багрилото Sofia Green. Отпипетират се с микропипета по 8  $\mu$ L в 4-те канала на микрочипа от сепарирания разтвор, следва пропускане на специфично възбуждане за багрилото dR110 и се определя общия брой CD34 клетки. По същия начин се процедира със супернатантата, но се осъществява последователно специфично възбуждане за АТТО620 и Sofia Green, при което се определят общия броя на CD45 клетки и броя на мъртвите CD45 клетки. От тяхната разлика се получава броя на живите CD45+ клетки. По аналогичен път се осъществява процедурата и с втората аликвотна проба, но се използва специфично възбуждане за Sofia Green и се определя общия брой мъртви клетки (мъртви CD34 и CD45 клетки). По разликата от общия брой мъртви клетки и броя мъртви CD45клетки определени в супернатантата се изчислява броя на мъртвите CD34 клетки. Живите CD34+ клетки се определят по

разликата от общия брой CD34 клетки определени в сепарирания разтвор и броя на изчислените мъртви CD34 клетки.

Жизнеспособността (Viability) на позитивните CD34+ стволови клетки се определя като съотношение между измерения брой CD34+ стволови клетки отнесен към общия брой CD34 клетки в клетъчната суспензия в %. Жизнеспособността (Viability) на позитивните CD45+ се определя като съотношение между измерения брой CD45+ клетки отнесен към общия брой CD45 клетки в клетъчната суспензия в %.

На таблица 7 са представени резултатите от анализирането на седем размразени аферезни проби по описания метод. Недостатъкът на този анализ е, че определянето на CD34+, CD45+ клетки и мъртви клетки, става поотделно и това може да повлияе негативно върху възпроизводимостта на резултатите.

**Таблица 7. Брой на CD34 + и CD45 + клетки в аферезни проби, определени с имобилизиран върху МНЧ конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 и анти-CD45 антитяло–АТТ0620 чрез „EasyCounter“ ВС**

<i>APH</i>	<i>Среден брой CD45+ (cells/μL)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Среден брой CD34+ (cells/μL)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>CD34/CD45 (%)</i>	<i>Жизнеспособност на CD34+ клетки (%)</i>
<b>1</b>	95 710	8,9	510	4,9	0,42	99,55
<b>2</b>	116 050	7,1	228	5,5	0,23	98,80
<b>3</b>	107 880	7,7	469	4,7	0,39	99,01
<b>4</b>	54 300	9,1	1152	5,9	2,00	99,60
<b>5</b>	108 524	7,8	397	5,8	0,39	99,35
<b>6</b>	119 401	7,3	395	4,8	0,38	99,15
<b>7</b>	113 921	7,5	529	4,5	0,46	98,46

Всяка проба се анализира десет пъти. Коефициентите на вариация (CV) на CD34+ клетките варират от 5,5 до 6,9%, а тези на CD45 + варират от 3,8 до 4,7% (Таблица 7). Установено е, че коефициентите на вариация са в рамките на допустимите нива при  $\leq 10\%$ . Жизнеспособността на CD34+ клетките е висока от 98,5 до 99,6%. Това означава, че условията за съхранение на криоконсервираните проби са подходящи.

Паралелно същите 7 аферезни проби се анализират в лабораторията по клинична хематология към УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна, с поточен цитометър BD FACS Canto II и търговски кит. Данните получени от EasyCounter BC и от поточния цитометър са сравнени. CV на броя на CD34+ клетките варира от 8,6 до 9,5%, а броя на тези на CD45+ клетки варира от 7,2 до 8,4% (Таблица 8). Определено е, че CV са в рамките на допустимите нива при  $\leq 10\%$ . Очевидно е, че CV на получените резултати от EasyCounter са по-малки от CV на получените резултати с поточен цитометър.

**Таблица 8. Брой на CD34+ и CD45+ клетки в аферезни проби, определени с поточен цитометър BD FACS Canto II**

<i>APH</i>	<i>CD45+ (cells/<math>\mu</math>L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>CD 34+ (cells/<math>\mu</math>L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>CD34/CD45 (%)</i>	<i>Жизнеспособност на CD34+ клетки (%)</i>
<b>1</b>	92 810	8,4	482,61	9,2	0,52	98,76
<b>2</b>	126 000	7,2	252,00	9,5	0,20	99,07
<b>3</b>	117 880	7,9	459,73	8,8	0,39	98,84
<b>4</b>	57 200	8,2	1149,74	8,6	2,01	99,65
<b>5</b>	109 430	7,8	399,43	9,1	0,37	99,35
<b>6</b>	109 601	8,1	394,55	9,2	0,36	99,37
<b>7</b>	126 921	7,5	526,70	9,4	0,42	99,06

Получените резултати показват, че анализите базирани на EasyCounter BC и на поточния цитометър, генерират много подобни данни. Между двата метода е изчислена корелацията на Пийрсън. Коефициентът на корелация между поточния цитометър и автоматичния клетъчен брояч при използване на имобилизирано върху МНЧ анти-CD34антитяло-dR110 е 0.97. Това демонстрира много висока корелация между двата метода. Освен това, когато се използва имобилизирано анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ, коефициентите на вариация са по-ниски от тези при използването на свободен анти-CD34антитяло-dR110 конюгат (резултати показани по-горе в Таблица 4).

#### **4. Имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на CD34+ клетки с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ и CD45+ клетки в проби от афереза и периферна кръв**

Разработен е имунофлуоресцентен анализ за броене на CD34+ и CD45+ клетки в аферезни проби с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ и конюгата анти-CD45антитяло-АТТ0620. Принципът на анализа е представен на фиг. 30. Анализът протича по следните етапи:

1. Към аферезната проба се добавя определен обем суспензия от имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ и определен обем разтвор на конюгат анти-CD45антитяло-АТТ0620.

2. Инкубиране 30 min за протичане на имунната реакция между конюгатите и съответните CD34 и CD45 клетки.

3. Добавяне на определен обем от разтвора на ядреното багрило RO-TEDM 1 за определяне броя на мъртвите клетки и инкубиране за 3 min.

4. Сепариране на магнитните комплекси с външен магнит.

5. Отделяне на супернатантата, съдържаща свързания конюгат анти-CD45антитяло–АТТ0620 към CD45 клетките.

6. Промиване на магнитните комплекси с буфер.

7. Ресуспендиране на магнитните комплекси в определен обем буфер.

8. Отпипетиране от ресуспендираните комплекси по 8  $\mu$ L в четирите канала на първи микрочип.

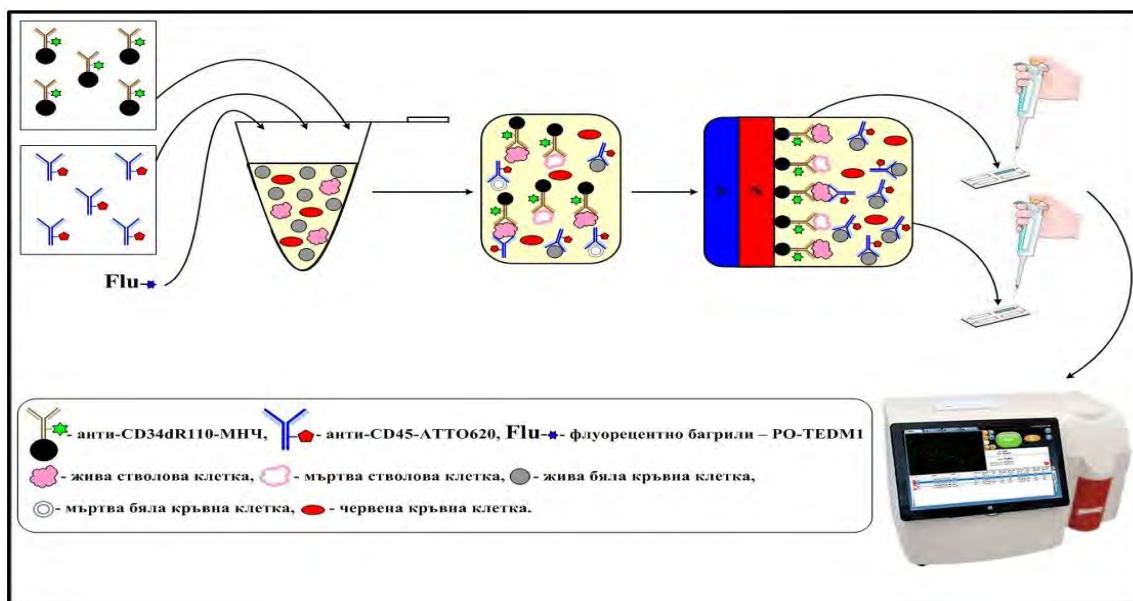
9. Пропускане на специфично възбуждане за багрилото dR110 в канал 1 и 2, за PO-TEDM 1 в канал 3 и 4.

10. Отпипетиране от разтвора на супернатантата по 8  $\mu$ L в четирите канала на втори микрочип.

11. Пропускане на специфично възбуждане за багрилото АТТ0620 в канал 1 и 2, за PO-TEDM 1 в канал 3 и 4.

На дисплея на апарата EasyCounter BC се появяват резултати за: общ брой CD34 клетки (tCD34); брой мъртви CD34 клетки; брой живи CD34+ клетки; общ брой CD45 клетки (tCD45); брой мъртви CD45клетки и брой живи CD45+ клетки.



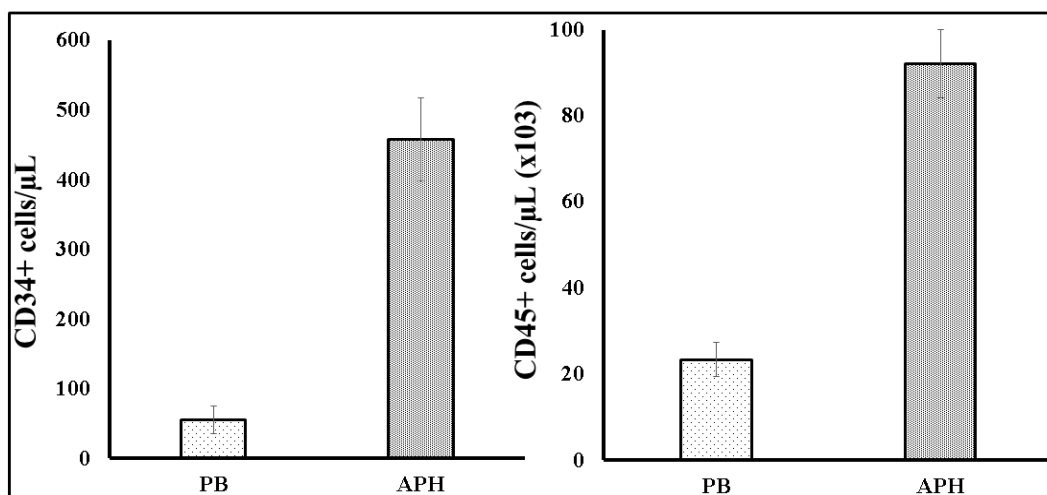


**Фиг. 30. Принципна схема за едновременно определяне на броя на  $CD34^+$  и  $CD45^+$  клетки определени съответно с имобилизиран върху МНЧ конюгат анти- $CD34$  антитяло-dR110 и анти- $CD45$  антитяло-ATTO620 чрез „EasyCounter“ BC**

С така описания метод се анализират аферезни проби и проби от мобилизирана периферна кръв (MPB). Към днешна дата най-използван източник за стволови клетки е периферната кръв, т.е. от циркулацията. От нея се извличат хемопоеичните стволови клетки, освободени от костния мозък. При нормални условия обаче той освобождава много малко такива клетки в циркулацията. За да се получат достатъчно стволови клетки от периферна кръв, е необходимо дарителят преди това да се подложи на стимулиращо лечение с растежни фактори, които стимулират производството на тези клетки и се получава мобилизирана периферна кръв. След това стволовите клетки се събират от кръвта на дарителя чрез афереза. Стволовите клетки в периферна кръв след проведената мобилизация се бележат като периферни кръвни стволови клетки (PBSC). В много центрове по хематология се

определя броя на стволовите клетки в периферна кръв (PBSC), тъй като те предсказват ефективността за събирането на стволови клетки чрез афереза на периферна кръв. Счита се, че е необходимо мониторирането на PBSCD34 + клетъчните концентрации, за да се прогнозира успеха или неуспеха на колекциите стволови клетки. Установено е, че концентрациите, получени чрез левкафереза, директно корелират с количественото определяне на CD34+ клетки в PB, но крайният добив, получен в аферезния продукт, е до известна степен променлив. Счита се за разумна гранична стойност за ефективно събиране на PBSC, когато броя на CD34 + клетките в PB е > 10 до 20 cells/ $\mu$ L. Тези стойности на CD34+ клетките са ниски и тяхното преброяване се затруднява. В тези случаи много подходящ се явява разработеният от нас метод с имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху магнитни наночастици. Чрез този метод е възможно да се приложи различна степен на клетъчна концентрация в зависимост от първоначалната концентрация на стволови клетки в PB.

Направени са експерименти за определяне на броя на CD34 + и CD45 + клетки в 9 аферезни проби и 9 проби от мобилизирана периферна кръв (MPB) по горе описаният метод. Определена е средно аритметичната стойност на броя CD34+ и CD45+ клетки, получен в двата вида проби. Резултатите са представени на фиг. 31.



**Фиг. 31. Едновременно определяне на броя на CD34+ и CD45 + клетки в проби от мобилизирана периферна кръв и аферезни проби, при използването на имобилизиран конюгат анти-CD34 антитяло–dR110 върху МНЧ, анти-CD45 антитяло–АТТ0620 и „EasyCounter“ ВС**

От фиг. 31 се вижда, че средния брой на CD34 + клетките е по-висок при афереза в сравнение с проби от РВ (съответно 458 срещу 55 cells/μL; р-стойност <0,001). Подобно е положението за CD45 клетките. Броят на CD45 клетките също е по-висок при афереза в сравнение с проби от РВ (съответно 92100 срещу 23370 cells/μL; р-стойност <0,001). Получените резултати показват добрия капацитет на провежданите аферези. Следователно, преброяването на РВ CD34+ родословните клетки трябва систематично да се използва за насочване на събирането на стволови клетки чрез афереза. Този параметър надеждно прогнозира крайния добив на стволови клетки. Това наблюдение ще доведе до увеличаване на степента на успех на колекциите от афереза, което прави тази процедура по-ефективна, намалява разходите и следователно елиминира допълнителни процедури на пациентите.

В заключение до сега, за определяне количеството на живи CD34+ клетки в аферезни проби, основно се прилага използването на поточна

цитометрия. Поточният цитометър е сложна и скъпа апаратура и изисква квалифициран специалист. Рутинният клиничен тест за изброяване на CD34+ клетки, трябва да притежава простота, висока чувствителност, точност, възпроизводимост и бързина. Доказано е, че EasyCounter BC е просто и рентабилно устройство, което осигурява точни, надеждни резултати и пониски коефициенти на вариация. Освен това тази система е технически лесна за използване. Апаратът е автоматизиран, със специален софтуер и измерването на апарата става за 3 минути. Така разработените от нас методи предлагат много добра алтернатива, тъй като получените резултати са сравними с резултатите получени с други инструменти, както и с референтни китове. Доказано е, че синтезираните от нас конюгати анти-CD34антитяло–dR110 и анти-CD45антитяло–АТТ0620 с успех могат да се използват за провеждане на анализите. Показан е потенциалът за преброяване на стволови клетки в проби от афереза и периферна кръв, използвайки имобилизиран върху МНЧ конюгат анти-CD34+ моноклонално антитяло–dR110. Имобилизираният върху МНЧ конюгат осигурява следните предимства – изолира и концентрира стволовите клетки, отделят се левкоцитите и те не пречат на броенето на стволовите клетки, възможно е да се приложи различна степен на клетъчна концентрация в зависимост от първоначалната концентрация на стволови клетки в пробата за афереза. Следователно новият метод и устройство осигуряват точно и бързо преброяване на стволовите клетки.

## ИЗВОДИ

1. Получени и пречистени са конюгати на анти-CD34антитяло с флуорохроми (FITC, dR-110) и са доказани чрез техните абсорбционни и флуоресцентни спектри. Определена е активността на двата анти-CD34 конюгата спрямо CD34 клетки в аферезни проби и е установено, че флуоресцентния конюгат анти-CD34антитяло-dR110 е с по-добра активност и флуоресцентен интензитет.
2. Получени и пречистени са конюгати на анти-CD45антитяло с флуорохроми (ATTO465 NHS ester и ATTO620 NHS ester) и са доказани чрез техните абсорбционни и флуоресцентни спектри. Определена е активността на двата анти-CD45 конюгата спрямо CD45 клетки в аферезни проби и е установено, че флуоресцентният конюгат анти-CD45антитяло-ATTO620 е с по-добра активност и флуоресцентен интензитет.
3. Разработен е индивидуален имунофлуоресцентен анализ за определяне на CD34+ клетки с помощта на синтезияния конюгат анти-CD34антитяло-dR110 и флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC.
4. Определен е линейния интервал на измерване на CD34+ клетки с EasyCounter BC (от 22,75 до 606,66 cells/ $\mu$ L), корелационния коефициент ( $R^2 = 0.99$ ) и коефициентите на вариация (CV от 6 до 9%).
5. Разработен е имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне броя на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба с помощта на синтезираните конюгати и флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC.
6. Доказано е, че резултатите получени със синтезираните конюгати и апарата EasyCounter BC са идентични с тези получени от поточен цитометър BD FACSCanto II в „Клинична лаборатория“, УМБАЛ „Света Марина“ – гр.

Варна, използвайки стандартен протокол и търговски BD кит за изброяване на стволови клетки.

7. Определено е, че коефициентите на вариация на резултатите получени със синтезираните конюгати и апарата EasyCounter BC са много близки с тези получени от поточен цитометър Guava (7-8%), докато при флуоресцентния микроскоп Olympus те са по-високи (14-17%).

8. Установено е, че условията на криоконсервиране на аферезните проби (5-8 месеца) са ефективни: средните проценти на възстановяване на стволовите клетки след размразяване са от 99,5 - 99,8%.

9. Определен е средния размер на синтезираните магнитни наночастици и количеството на amino групите на модифицираните МНЧ (изходни - 6,6 nm, функционализирани - 8,18 nm и amino групи 0,029 mgeqv/g МНЧ).

10. Установено е количеството имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху магнитните наночастици по карбодиимидния метод - 25 µg/mg МНЧ.

11. Определена е активността на имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ спрямо CD34 клетки в аферезни проби и е установено, че резултатите са сравними с тези получени с търговския кит и стандартния поточно-цитометричен метод.

12. Разработен е имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+ клетки съответно с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ и анти-CD45антитяло-ATTO620 при използването на EasyCounter BC.

13. Доказано е, че благодарение на имобилизирания конюгат върху МНЧ и прилагането на външно магнитно поле, може да се постигне сепариране и концентриране на свързаните към конюгата стволови клетки и съответно по прецизно преброяване.

14. Постигнат е висок корелационен коефициент (0.97) между разработеният метод с имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ, с анти-CD45антитяло-АТТО620 и със стандартен поточно-цитометричен метод (BD FACS Canto II и търговски кит).

15. Доказано е, че хетерогенният метод е много подходящ за преброяване на CD34+ клетки в аферезни проби и особено в мобилизирана периферна кръв, съдържаща ниска концентрация на стволови клетки, поради възможността да се изолират и концентрират клетките.

### **НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ**

1. Синтезирани са два нови конюгати за определяне броя на CD34+ и CD45+ клетките - анти-CD34антитяло-dR110 и анти-CD45антитяло-АТТО620.

2. 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.

3. За първи път е разработен имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+ клетки с имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ, осигуряващ сепариране и концентриране на свързаните към конюгата стволови клетки и съответно по прецизно преброяване.

## СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

1. Krasteva D.R., Y.L. Ivanov, T.G. Chervenkov, K.I. Gabrovska, T.I. Godjevargova (2020) CD34+ stem cell counting using labeled immobilized anti-CD34 antibody onto magnetic nanoparticles and EasyCounter BC image cytometer, *Anal Biochem.* 610 (2020) 113929. (*Impact factor: 2.877*)
2. Krasteva D., Y. Ivanov, Z. Chengolova (2021) Simultaneous enumeration of CD34+ and CD45+ cells using EasyCounter image cytometer, *Anal Biochem*, YABIO-D-21-00352 (*Impact factor: 2.877*) (изпратена).
3. Krasteva D., K. Gabrovska, T. Godjevargova (2018) Preparation of anti-CD34 antibody–FITC and anti-CD45 antibody–ATTO465 conjugates for immunofluorescence image cytometric assay of leukocyte and stem blood cells, Assen Zlatarov University Burgas, Bulgaria Annual vol. XLVII, book1, Technical and natural sciences.
4. Krasteva D., Y. Ivanov, K. Gabrovska (2020) Counting of CD45+ Cells with EasyCounter BC Automatic Fluorescence Microscope Using Anti-CD45 Antibody Conjugate, Assen Zlatarov University Burgas, Bulgaria Annual vol. XLIX, book1, Technical and natural sciences.



## ЦИТАТИ

на публикацииите по дисертацията: 1 цитат

1. Krasteva D.R., Y.L. Ivanov, T.G. Chervenkov, K.I. Gabrovska, T.I. Godjevargova (2020) CD34<sup>+</sup> stem cell counting using labeled immobilized anti-CD34 antibody onto magnetic nanoparticles and EasyCounter BC image cytometer, Anal Biochem. 610 (2020) 113929. (*Impact factor: 2.877*)

Zou D., J. Li, F. Kou, X. Luo, P. Yang (2021) Reveal crucial subtype of natural chondroitin sulfate on the functionalized coatings for cardiovascular implants, J Mater Sci Technol, 9, 67–77. (*Impact factor: 6.155*)

## УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. International Conference CHIMIA 2018 “New trends in applied chemistry” – 24-26.09.2017год. в Констанца, Румъния. Тема: „ Preparation of conjugate of anti-CD45 antibody with fluorochromes FITC and ATTO465“.

2. The 5th International Conference - New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences” – 3-4.07.2020год. в Букурещ, Румъния. Тема: „ Counting of CD45-cells by automatic fluorescence microscope EasyCounter BC using anti-CD45<sup>+</sup> antibody conjugate “.

3. European Biotechnology Congress 2020 (24-26 Септември), Прага. Тема: „ Comparison of CD34<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup> cells enumeration by three different fluorescent methods“. To cite this article: (2021) Poster Abstracts, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35:sup1, S62-S128, DOI: 10.1080/13102818.2020.1871545.

## **УЧАСТИЕ В СТУДЕНТСКИ НАУЧНИ СЕСИИ**

1. Участие на „Научна сесия – 2018” в университет „Проф. д-р Асен Златаров” с доклад на тема: „Приготвяне на флуоресцентни конюгати на анти-CD45 антитяло с флуоресцеин изотиоцианат и АТТО465”.
2. Участие на „Научна сесия – 2019” в университет „Проф. д-р Асен Златаров” с доклад на тема: „ Методи за определяне концентрацията на стволови клетки в аферезни проби“.

**Списък на фигурите и таблиците, включени в Автореферата и тяхната  
номерация в Дисертацията**

<i>Номер на фигурата в Автореферата</i>	<i>Номер на фигурата в Дисертацията</i>
Фигура 1	Фигура 20
Фигура 2	Фигура 21
Фигура 3	Фигура 22
Фигура 4	Фигура 23
Фигура 5	Фигура 24
Фигура 6	Фигура 25
Фигура 7	Фигура 26
Фигура 8	Фигура 27
Фигура 9	Фигура 28
Фигура 10	Фигура 29
Фигура 11	Фигура 30
Фигура 12	Фигура 31
Фигура 13	Фигура 32
Фигура 14	Фигура 33
Фигура 15	Фигура 34
Фигура 16	Фигура 35
Фигура 17	Фигура 36
Фигура 18	Фигура 37
Фигура 19	Фигура 38
Фигура 20	Фигура 39
Фигура 21	Фигура 40
Фигура 22	Фигура 41
Фигура 23	Фигура 42
Фигура 24	Фигура 43
Фигура 25	Фигура 44
Фигура 26	Фигура 45
Фигура 27	Фигура 46
Фигура 28	Фигура 47
Фигура 29	Фигура 48
Фигура 30	Фигура 49
Фигура 31	Фигура 50

<i>Номер на таблицата в Автореферата</i>	<i>Номер на таблицата в Дисертацията</i>
<b>Таблица 1</b>	Таблица 3
<b>Таблица 2</b>	Таблица 4
<b>Таблица 3</b>	Таблица 5
<b>Таблица 4</b>	Таблица 6
<b>Таблица 5</b>	Таблица 7
<b>Таблица 6</b>	Таблица 8
<b>Таблица 7</b>	Таблица 9
<b>Таблица 8</b>	Таблица 10