

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Велизар Костадинов Гочев,
ръководител на катедра „Биохимия и микробиология“
при Биологически факултет на ПУ „П.Хилендарски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“
в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление
5.11 Биотехнологии, докторска програма (Технология на биологично активните вещества,
вкл. ензими, хормони и белтъци)

Автор: *Димитрина Румянова Кръстева*

Тема: *Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки на база магнитни наночастици*

Научни ръководители: *доц. д-р Катя Габровска и доц. д-р Явор Луканов*

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № УД – 166 от 19.07.2021 г. на Ректора на Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ Бургас, съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „*Имунофлуоресцентен анализ на стволови клетки на база магнитни наночастици*“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11 Биотехнологии, докторска програма Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони и белтъци).

Автор на дисертационния труд е *Димитрина Румянова Кръстева* – докторантка към катедра „Биотехнология“ при Факултет по технически науки с научни ръководители доц. д-р Катя Габровска и доц. д-р Явор Луканов от Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ Бургас. Представеният от докторантката комплект материали е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ Бургас и включва следните документи:

- автобиография в европейски формат;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;

- списък на забелязани цитирания;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

Съдържанието на представените документи ми позволява да определя процедурата като законосъобразна.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантката Димитрина Кръстева притежава ОКС „бакалавър” от Университета по хранителни технологии, професионална квалификация „инженер – технолог” и ОКС „магистър”, професионална квалификация „инженер – биотехнолог” от Университет „Проф. д-р Асен Златаров” Бургас. Димитрина Кръстева притежава професионални квалификации „учител по химия” и „учител по биология”, придобити от Университет „Проф. д-р Асен Златаров” Бургас. Считаю, че образованието и придобитите квалификационни степени са предпоставка за изграждане на докторантката като изследовател в сферата на биотехнологиите.

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

През последните години, интересът на изследователи и клиницисти неизбежно е фокусиран върху възможностите за ефективна терапия на злокачествените заболявания, които са един от основните медицински проблеми на съвременното общество. Трансплантацията на хематопоеични стволови клетки (HSC) се превръща в стандарт за лечение на пациенти с нарушена хематопоеза и различни злокачествени заболявания, но за да се увеличи нейната ефективност е необходимо да се гарантира достатъчно висок брой жизнеспособни CD34+ клетки в аферезните проби. Освен всички други фактори, важна предпоставка за това е разработването и прилагането на точни, експресни и икономически изгодни методи за количествено определяне на стволови клетки. За тази цел в клиничната лабораторна практика, като стандарт се прилага проточната флоуцитометрия. Сравнително по-слабо проучена е възможността за приложение на хетерогенните имуофлуоресцентни методи за определяне на стволови клетки и левкоцити, които биха могли да намерят приложение в практиката като потенциална алтернатива. Много успешно, още в началото на дисертационния труд, в частта Въведение, се поставя изследователския проблем и се заявява претенцията за практическата значимост на изследването. В този смисъл темата на дисертационния труд категорично може да бъде определена като актуална и важна в научно-приложен аспект.

Целта на дисертацията е ясно и точно формулирана, като тя директно произтича от заключителния анализ, направен в раздела Литературен обзор. Поставените изследователски задачи са подредени в логична последователност и дават ясна представа за обхвата и етапите на проучването, но начинът, по който са формулирани, твърде фрагментирано, създава усе-

щане, че е представена подробна изследователска програма, а не стратегически задачи за реализация на поставената цел. Смятам, че е било възможно задачите да бъдат формулирани по-общо, групирани принципно, например да се обединят задачи 1 и 2, задачи 3, 4 и 5, задачи 7 и 8, задачи 11 и 12. Независимо от начина на формулирането им задачите категорично са предпоставка за успешна реализация на целта на дисертационното изследване.

4. Познаване на проблема

Библиографията на дисертацията включва 207 литературни източника, които обхващат 30-годишен период, като 25 % от тях са от последните 10 години, което ми позволява да определя литературния обзор като изчерпателен. В него последователно са разгледани структурата, функцията и генезиса на стволовите клетки и левкоцитите, подробно са разгледани възможностите за клинично приложение на стволовите клетки и различните трансплантационни схеми. Много подробно са описани структурата и функцията на антителата, видовете флуоресцентни багрила и методите за получаване на конюгати антитяло-флуоресцентен маркер. Представени са предимствата и недостатъците на различни техники за получаване на магнитни наночастици и методите за имобилизация на биомолекули. В детайли са съпоставени различни протоколи за проточно флоуцитометрично определяне на CD34+ хематопоеични стволови клетки. В обзора е поставен акцент върху възможностите за приложение на имуномагнитната сепарация на стволови клетки и флуоресцентната образна цитометрия като метод за тяхното броене. Положително впечатление прави сравнителното разглеждане на различните магнитни наночастици, методи за имобилизация, сепарация и броене на стволовите клетки с изтъкване на техните предимства и недостатъци, т.е докторантката е направила успешен опит за критичен преглед на литературата. Положително оценявам решението този раздел да завърши с кратко заключение от което да изкристализират работната хипотеза на изследователския екип, целта на дисертационния труд, неговата актуалност и практическо значение. Начинът на оформяне на обзора показва, че докторантката е много добре запозната с разработвания проблем. Известен недостатък на обзора е твърде „учебнически“ му стил с огромно количество обща информация за структура на антитела, принципи на HPLC, гел-филтрация и др., която определно би могла да бъдат спестена, имайки предвид, че работата е предназначена за четене и представяне пред специализирана аудитория. От друга страна подобен подход показва добрата теоретична подготовка на докторантката.

5. Методика на изследването

Постановката на експерименталната схема на едно дисертационно изследване и изборът на методически инструментариум за реализацията му до голяма степен е отговорност на на-

учните ръководители, а усвояването и адаптацията на методите към конкретните условия и начина на представянето им в дисертационния труд е отговорност на докторанта. Постановката на експериментите е правилна, а подобрените методи са адекватни на целта и съвременното равнище на науката. Методите са представени по начин, който доказва, че Димитрина Кръстева е овладяла и приложила достатъчен обем аналитични техники, което е най-същественният атестат за успешната реализация на образователната компонента на докторската програма. Към графата препоръки към този раздел на дисертацията биха могли да бъдат изискани дейтали за провеждане на някои от клиничните изследвания, данни за статуса на дарителите и спазване на съответните изисквания за участие в научното изследване и др., но приемам, че всичко това е проведено на територията на болнично заведение, извън Университет „Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас и докторантката е получила готови проби.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран по възприетия начин и включва разделите Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Изводи, Приноси и Използвана литература. Дисертационният труд е балансиран по отношение обема на отделните раздели с акцент върху дискусията. Обемът на литературния би могъл да бъде редуциран. Целта е ясно и точно формулирана, а мотивацията за провеждане на изследването е добре дефинирана още в края на раздела Въведение и заключителния анализ в раздела Литературен обзор. Експерименталната работа започва с получаване и пречистване на конюгати на анти-CD34антитяло с флуорохроми (FITC, dR-110). 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. Получени и пречистени са и конюгати на анти-CD45антитяло с флуорохроми (ATTO465 NHS ester и ATTO620 NHS ester). 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. Работата по дисертацията продължава с разработване на метод за имунофлуоресцентен анализ на CD34+ клетки с помощта на синтезирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 и флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC. Определен е линейният интервал на измерване на CD34+ клетки с EasyCounter BC (от 22,75 до 606,66 cells/ μ L), корелационния коефициент ($R_2 = 0.99$) и коефициентите на вариация (CV от 6 до 9%). Разработена е процедура за едновременно имунофлуоресцентно определяне на броя на CD34+ и CD45+ клетки в една и съща проба с помощта на синтезираните конюгати и флуоресцентен образен цитометър EasyCounter BC. Получените резултати от разработения метод са сравнени със същите, получени чрез стан-

дартно флоуцитометрично определяне по референтния метод в „Клинична лаборатория“, УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна, използвайки стандартен протокол и търговски BD кит за изброяване на стволови клетки. Установено е, че коефициентите на вариация на резултатите получени със синтезираните конюгати и апарата EasyCounter BC са съпоставими с тези получени от проточен флоуцитометър. Синтезирани и функционализирани са магнитни наночастици с размери - 8,18 nm и аминокупри 0,029 mg_{eqv}/g МНЧ. Прилагайки карбодиимиден метод е имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 - 25 µg/mg МНЧ. 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 проточно цитометричен метод. Разработен е имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+ клетки съответно с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ и анти-CD45антитяло-АТТО620 при използването на EasyCounter BC. Чрез прилагане на външно магнитно поле е постигнато сепариране и концентриране на свързаните към конюгата стволови клетки, което води до по прецизното им изброяване. Постигнат е висок корелационен коефициент (0.97) между резултатите, получени по разработения метод с имобилизирания конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ, с анти-CD45 антитяло-АТТО620 и същите, получени със стандартен проточно флоуцитометричен метод. Считаю, че получените резултати са коректно дискутирани. Изводите се базират на получените резултати и поставените задачи, но начинът, по който са формулирани им придава звучене на приноси. Някои от изводите биха могли да се редактират, например по подходящ начин биха могли да се обединят Изводи 13 и 15. Напълно осъзнавам, че формулирането на изводите и приносите е най-трудната част от работата на докторантите, поради което считаю, че към недостатъците в този раздел, трябва да бъдем най-толерантни.

Мотивацията на работната хипотеза, ялната цел, обхвата на експерименталното изследване, начина на представяне на резултатите и тяхната интерпретация, коректната формулировка на изводите и приносите, оформят цялостното положително впечатление от дисертационния труд.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приемаю формулираните приноси и категоризацията им като научно-приложни. Определяю приносите, свързани със синтезирането на двата нови конюгати за определяне броя на CD34+ и CD45+ клетките - анти-CD34антитяло-dR110 и анти-CD45антитяло-АТТО620 и разработения имунофлуоресцентен анализ за едновременното определяне на CD34+ и CD45+

клетки с имобилизиран конюгат анти-CD34антитяло-dR110 върху МНЧ, като такива с оригинален характер.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са представени три научни публикации – една статия публикувана в реномираното списание *Analytical Biochemistry* (IF₂₀₂₀ 3.365, SJR₂₀₂₀ 0.63, Q3), индексирано в базите данни на *Scopus* и *Web of Science*, и две публикации в научни трудове на ВУЗ – годишник на Университет „Проф. д-р Асен Златаров” Бургас. И в трите публикации са отразени съществени резултати от дисертационния труд. Атестат за качеството на получените резултати и актуалността на разработваната тематика е забелязаният положителен цитат в *Journal of Material Science and Technology* (IF₂₀₂₀ 8.067).

9. Лично участие на докторантката

Трябва да се отбележи, че докторантката е водещ автор на всички приложени статии и представяния на конференции, което показва ключовата роля на Димитрина Кръстева за тяхната реализация. Не мога, обаче да не адмираирам и факта, че научните ръководители са гласували доверие на докторантката и са ѝ поверили водещо авторство, независимо, че съм напълно убеден в тяхната огромна помощ при написване на публикациите.

10. Автореферат

Авторефератът е оформен в съответствие с възприетите стандарти и отразява вярно и точно етапите на изследването, по-важните резултати, изводи и приноси.

11. Критични забележки, препоръки и въпроси

Нямам съществени критични забележки към постановката на изследването, получените резултати и тяхната интерпретация. Забележките ми към отделни части на дисертацията, които вече отбелязах в изложението си, са главно редакторски, отразяват мои лични виждания по оформяне на работата и би следвало да се възприемат по-скоро като предложения, а не като фиксация на пропуски.

Към докторантката имам следния въпрос: *Запозната ли сте с етапите, през които преминава даден метод за анализ, преди да бъде въведен като стандарт в клиничната лабораторна практика и в този ред на мисли каква считате, че ще бъде съдбата на разработения от Вас метод?*

12. Лични впечатления

Не познавам докторантката и нямам лични впечатления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научно-приложни и приложни резултати, които отговарят изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ Бургас. Дисертационният труд показва, че докторантката *Димитрина Румянова Кръстева* притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност 5.11 Биотехнологии като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и *предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“* на *Димитрина Румянова Кръстева* в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11 *Биотехнологии*, докторска програма *Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони и белтъци)*.

Подпис заличен
Чл.2 от ЗЗЛД

22.09. 2021 г.

Рецензент:

(проф. д-р Велизар Гочев)