

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация „Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски метод за анализ на соматични клетки и неутрофили в мляко”, представена от Златина Руменова Бечева – докторант в катедра „Биотехнология” при Университет „Проф. д-р Асен Златаров”, за присъждане на образователна и научна степен „доктор” по научна специалност Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини), шифър: 02.11.11.

Рецензент: доц. д-р Недялка Димова Димова

Златина Бечева е завършила Университет „Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас, специалност Биотехнологии през 2013 г. През юли 2014 г. е придобила магистърска степен инженер-биотехнолог по програма „Анализ и контрол на храни”, а от ноември същата година е зачислена на редовна докторантура в катедра „Биотехнология” на У „Проф. д-р Ас. Златаров”, Бургас. Темата ѝ е свързана с разработване на метод за анализ на краве мляко.

Производството на качествено краве мляко удовлетворява завишените изисквания на пазара и очакванията на крайните консуматори. Законите разпоредби у нас позволяват изкупуването на мляко с определено качество. По-важните характеристики, които го определят са – външен вид, масленост, плътност, белтъчно съдържание, сух безмаслен остатък, киселинност, чистота и др. Количеството на соматичните клетки в млякото е показател за здравословното състояние на животното. Общият брой соматични клетки (ОБСК) е включен като показател при окачествяването на суровото мляко наред с общия брой на микроорганизмите. Според изискванията на ЕС суровите млека трябва да съдържат под 400 000 cell/mL ОБСК. Ако те са повече от нормалното, това означава, че в животното се развиват възпалителни процеси - например скрит или явен мастит. Млекоотделянето и въобще функцията на млечната жлеза силно се затруднява при увеличаване на ОБСК.

Определянето на общия брой соматични клетки стои в основата на съвременните тестове за определяне на млякото като маститно или немаститно. Тази информация, обаче не е достатъчна за проследяване здравето на животното, както и навременното справяне с възникнала инфекция.

В литературата не се намира много информация за определяне на неутрофили и на тяхна база на соматични клетки в мляко. Не се откриват и данни за приложение на имунофлуоресцентен метод за определяне на соматични клетки на базата на специфични антители срещу неутрофилна еластаза. Такъв метод би бил подходящ за ранна диагностика на мастит и предотвратяване на значителни икономически загуби.

Дисертационната работа на Златина Бечева е посветена на създаване имунологичен тест на базата на реакцията антияло-антиген, в съчетание с

флуоресцентна детекция, който да даде възможност за количествено определяне на неутрофили и соматични клетки. Това определя значението и актуалността на темата на дисертацията.

Дисертацията е структурирана и написана по общоприетия начин. Обемът ѝ е 157 страници. Тя съдържа разделите литературен обзор, цел и задачи, експериментална част, резултати и обсъждане, изводи, научни и приложни приноси и литература. Включен е и списък с публикациите по темата. Декларация за оригиналност удостоверява истинността на проведените от докторантката експерименти и представените резултати.

Литературният обзор е оформен на базата на 192 литературни източника, всички на английски език, а 46% от тях са публикувани след 2000 г., което показва актуалността на проблема и в международен мащаб. Обзорът съдържа богата, добре структурирана и подредена информация върху разглежданите проблеми, включваща 11 фигури и 4 таблици. В основната си част той е в пряка връзка с дисертационната работа и илюстрира информираността, и компетентността на докторантката по темата на дисертацията. В него са разгледани механизмът на формиране на соматичните клетки и видовете им в млякото, функцията им и тяхното влияние върху качеството на млякото и млечните продукти. Изяснена е и ролята на неутрофилите и неутрофилната еластаза при деструкцията на микроорганизмите. Логично, във връзка с темата в литературния преглед са включени и въпроси, свързани с получаването, пречистването и доказването на антитела, необходими за разработване на имунологични тестове; видовете флуоресцентни багрила и приложението им за получаване на конюгати антитяло-флуорохром.

Целите и основните направления на изследванията в дисертационната работа са дефинирани във втория раздел от дисертацията. За реализирането им са поставени 7 задачи – добре формулирани и в логична последователност. Те са разпределени в три направления: 1) изолиране, пречистване и доказване на неутрофили и неутрофилна еластаза; 2) получаване, пречистване и доказване на антитела срещу неутрофили и еластаза, както и на съответните флуоресцентни конюгати; 3) разработване на имунофлуоресцентни микроскопски методи за определяне на общ брой соматични клетки и неутрофили в краве мляко.

В Експериментална част са описани точно и подробно използваните при изследванията методи за: изолиране и доказване на кръвни и млечни неутрофили от кръв и мляко на здрава крава и от маститно мляко; получаване, доказване и пречистване на поликлонални антитела, специфични за неутрофили и неутрофилна еластаза от крава; получаване, пречистване и доказване на флуоресцентни конюгати на получените антитела; определяне на крос-реактивността на получените флуоресцентни конюгати с кръвни клетки от крава. Описани са и имунофлуоресцентните микроскопски анализи на соматични клетки от краве мляко с получените флуоресцентни конюгати. Материалите, включени в тази част показват, че в методичен план дисертационният труд е разработен чрез подходящи и правилно подбрани методи за анализ и обработка на резултатите.

В раздела Резултати и обсъждане са представени резултатите по реда на задачите, формулирани във втори раздел. Те са поместени в 6 таблици и на 37 фигури.

В първата задача са включени изследванията, свързани с изолиране на неутрофили от кръв на крава с утаяващи агенти водоразтворими полимери - поливинилпиролidon (PVP) и декстран, като са изследвани пет модела за утаяване на кръвните клетки. По-добри резултати са получени чрез утаяване на неутрофилите с трикомпонентния реагент Ficoll, който дава възможност за разделяне на кръвните клетки чрез центрофугиране в плътностен градиент. При това са изолирани неутрофили с полиморфосигментирани ядра.

С изолираните неутрофили и неутрофилни фрагменти е получено овче анти-неутрофил антитяло (IgG), което е пречистено с афинитетна хроматография. Определени са активността и специфичността на полученото антитяло, на базата на което са установени оптимална работна концентрация за анти-неутрофил антитяло 500 µg/mL и граница на откриване на неутрофилни фрагменти 5 µg/mL. Чрез определяне на крос-реактивността на антитялото е установена 100%-та му селективност спрямо кръвните и млечни неутрофили, в сравнение с много ниската му активност спрямо мононуклеарни клетки от кръв и мляко. Това е показател за потенциалните възможности на полученото антитяло за определяне на количеството неутрофили в краве мляко. За да се включи то в имунофлуоресцентен анализ докторатката го е конюгира с флуоресцентно багрило. За целта е използван флуоресцеин изотиоцианат (FITC). Полученият конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC е пречистен и доказан, и е използван за микроскопско визуализиране на кръвни клетки от крава.

Създаденият имунофлуоресцентен микроскопски анализ на базата на конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC е сравнен с комерсиален микроскопски метод за диференциално броене на клетките с багрило. Установено е много добро съответствие между двата метода при анализ на неутрофили в мляко в граници от 7% до 80%. Корелационният коефициент на създадения анализ е 0.974, като предимства му са ясното оцветяване на клетките и краткото време за анализ (70 min), в сравнение с комерсиалния метод.

По-нататък е разработен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на еластаза на базата на анти-еластаза антитяло. Еластазата е протеолитичен ензим, съдържащ се в неутрофилите, който притежава защитна функция при възпаление на млечната жлеза. При наличие на мастит се увеличава количеството на неутрофили в кравето мляко, съответно и количеството на еластазата. Затова подобно на неутрофилите, еластазата може да бъде използвана като маркер за определяне на състоянието на млечната жлеза. В маститното мляко, тя се съдържа както в неутрофилните клетки, така и в свободно състояние в млякото от разкъсаните такива. След разкъсване на целите клетките, е освободено допълнително количество неутрофилна еластаза. Общото ѝ количество е определено чрез високоефективна течна хроматография с обърната фаза (RP-HPLC).

Еластазата, необходима като имуноген за получаване на анти-еластаза антитяло е изолирана от неутрофили от кръв на здрава крава, която е пречистена чрез йонообменна хроматография на колона SP Sepharose и градиентно елуиране с NaCl с различна концентрация. От пречистената неутрофилна еластаза са получени овчи поликлонални анти-еластаза антители. Активността им е определена чрез индиректен ELISA метод. Установена е оптимална работна концентрация на анти-еластаза антитялото 600 µg/mL и граница на откриване на неутрофилна еластаза с с полученото анти-еластаза антитяло - 1 µg/mL.

След установяване на свойствата на полученото анти-еластаза антитяло, с него са приготвени флуоресцентни конюгати, за да се разработи имунофлуоресцентен анализ за определяне на неутрофили в краве мляко. Антитялото е белязано с флуоресцентно багрило флуоресцеин изотиоцианат (FITC). За пречистяване и доказване на получения конюгат са използвани гел-филтрация (Sephadex G25) и спектофотометрични методи (UV-Vis и флуоресцентен). За сравнение като конюгиращи агенти са използвани и други флуоресцентни маркери - квантови точки - QD 620 nm и QD 710 nm, поради високия флуоресцентен сигнал (оранжево-жълт за анти-еластаза антитяло – QD 620 nm и наситено червен за анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) и добрата им стабилност при съхранение.

На база на флуоресцентните конюгати са създадени имунофлуоресцентни микроскопски анализи на неутрофили в кръв и на соматични клетки в мляко на крава. Докторантката установява, че активността на конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm е по-голяма от активността на анти-еластаза антитяло – FITC, което тя обяснява с „по-големия размер на квантовите точки (QD), при което се създава по-голямо разстояние между антитялото и маркера и се осигурява по-висока активност на конюгата“.

Получените имунофлуоресцентни микроскопски анализи на база на анти-неутрофил антитяло – FITC и анти-еластаза антитяло – QD 710 nm за определяне на неутрофили в краве мляко са валидирани и сравнени със стандартен Giemsa-микроскопски метод и показват корелационни коефициенти над 0.957. Това е дало основание на докторантката да приложи конюгатът анти-еластаза антитяло – QD 710 nm за определяне процентното съдържание на неутрофили, спрямо общия брой на соматичните клетки (ОБСК) в реални проби мляко.

Тъй като е установено, в съответствие и с други автори, че флуоресцентните конюгати пряко зависят от свойствата и стабилността на използвания флуоресцентен маркер, е предпочетено получените конюгати да се съхраняват в лиофилизирано състояние. Установено е също, че флоростабилността на флуоресцентните конюгати при съхранение в рамките на 30 дни се запазва за конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm до 95%, а за конюгата анти-еластаза антитяло – FITC остатъчната интензивност е 60%

Разработените имунофлуоресцентни микроскопски анализи с двата вида антителя успешно са приложени за определяне на неутрофили в мляко, като линейният интервал и при двата метода е от 20 000 до 1 000 000 cells/mL ОБСК.

Въпреки по-добрите характеристики на конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm, докторантката приема за по-перспективно използването на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC, поради възможността за двуцветен анализ чрез добавянето на пропидиев йодид (PI). Комбинирането на PI, който оцветява всички соматични клетки в червено, с конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC, който дава зелена емисия при свързването си само с неутрофилите, осигурява едновременно определяне на неутрофили и ОБСК. От друга страна, използването на другия конюгат за определяне на неутрофилните клетки (без ОБСК) може да доведе до занижени резултати, тъй като при маститно мляко част от еластазата излиза извън разкъсаните клетки и не може да се регистрира.

На базата на литературни данни е обобщено, че до сега за определяне на количеството неутрофили в млякото основно е използвана поточна цитометрия. В табл. 11 от дисертацията са представени сравнителни данни, получени от други автори. Въпреки по-високата точност на този метод се отчита, че за пратическо приложение той не е подходящ за измерване на соматични клетки в мляко, тъй като апаратурата е сложна, скъпа и изисква обучени специалисти.

В съответствие с поставените задачи, а именно разработване на имунофлуоресцентен микроскопски метод за определяне на неутрофили, който да даде възможност за бърз, лесен метод с възможност за адаптиране към преносим апарат, дисертантката е разработила методи, които предлагат много добра алтернатива. Освен това, получените резултати са сравними с вече използваните и разработени други методи от различни автори.

В заключителната част са направени 11 обобщени извода, в които са резюмирани резултатите от изследванията по поставените задачи. Те са добре формулирани и произтичат изцяло от експерименталните резултати.

Научните и приложните постижения в докторската дисертация са представени чрез формулираните 6 научно-приложни приноси. Те могат да бъдат отнесени към категорията приноси, чрез които се обогатяват теоретическите и практическите знания в областта, в която са проведени изследванията.

Части от резултатите по дисертационната работа са публикувани в пет статии, от които две в списания с импакт фактор - *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology* (*Impact factor: 1.06*) и *Food and Agricultural Immunology* (*Impact factor: 1.392*), а останалите – в Научни трудове на Русенския университет “Ангел Кънчев” – филиал Разград на английски език. Статиите са в съавторство, като във всички Златина Бечева е на първо място. Представени са и участия в три научни конференции – две на Научна конференция с международно участие на Русенски университет “Ангел Кънчев” – филиал Разград, 2015 и 2016 г. и едно на 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 2017, Brasov, Romania.

Авторефератът е в обем 43 страници и е със структура и съдържание, съответстващи на раздела Резултати и обсъждане от дисертацията – включва 6 таблици и 34 фигури.

Забележките, които искам да направя не се отнасят към дисертационната работа, която напълно отговаря на поставените задачи и получените резултати са напълно обнадеждаващи за практическа реализация. Те се отнасят към формулирането на приносите, които според мен би трябвало по-смело да подчертаят новото в получените резултати. А именно:

1. Първите два приноса, според мен, не отразяват съществен и нов момент в научната работа, ако има такъв, то би трябвало да се подчертае какво е новото и какъв е приносът.
2. Трети и четвърти принос биха могли да се обединят.
3. Като цяло приносите до някъде повтарят изводите и не дават реална представа за най-ценното в работата.

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

1. Разработването за първи път на имунофлуоресцентни микроскопски анализи на базата на антитела срещу неутрофилна еластаза с линеен обхват в широк интервал - от 20 000 до 1 000 000 cells/mL ОБСК.
2. Разработването на едновременен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на соматични клетки и неутрофили в една и съща проба, което ще позволи да се прави по-точна и категорична диагностика на мастита на ранен етап.
3. Практическа реализация на разработените имунофлуоресцентни микроскопски анализи за определяне на неутрофили в краве мляко чрез включването им към произведания от фирма Милкотроник преносим брояч на клетки Lactoscan SCC.

По дисертационната работа имам следните въпроси:

1. Как може да се обясни по-високата фотостабилност на конюгата анти-еластаза-антитяло-QD (95%) от тази на анти-еластаза-антитяло-FITC (95%) на 30-ия ден?
2. Най-новата информация за определяне на количеството неутрофили в мляко с използване на поточна цитометрия, които сте представили в сравнителна табл. 11 от дисертацията, е от 2003 г. Не сте ли срещали работи по този въпрос от по-късни периоди?

### **Заклучение**

Дисертационната работа на Златина Бечева е свързана с решаването на важни проблеми, които стоят пред производители и анализатори за осигуряване на качествени и безопасни храни за потребителите, за удовлетворяване на завишените изисквания на пазара и от друга страна - за ранна диагностика на мастит при млекодайните животни и предотвратяване на значителни икономически загуби.

Тя представлява едно задълбочено изследване на възможностите за създаване на бързи и ефективни методи и тестове за анализ и контрол на мляко.

В процеса на разработване на дисертацията си докторантката е разширила и задълбочила своите знания в областта на имуноанализа с използване на различни белязващи агенти, методи за конюгиране, методи за анализ и др. Придобила е умения да събира и обработва научна информация, да планира и извършва експериментална дейност, да анализира и обобщава получените резултати.

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

Януари, 2018 г.

Бургас

Рецензент:.....  
/доц. д-р Н. Димова/