

Рецензия
на дисертационен труд
за получаване на научната и образователна степен „Доктор”

автор на дисертацията: *Августина Красимирова Данаилова*

тема: *Калориметрични маркери за диагностика с мониториране на онкохематологични заболявания*

научени ръководители: *проф. Стефка Танева, дбн*

доц. д-р Сашка Крумова

рецензент: *доц. д-р Биляна Николова*

Августина Данаилова е родена през 1988г. През 2014г се дипломира като магистър от СУ „св. Кл. Охридски”, Биологически факултет. През 2015г е зачислена за редовен докторант към секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия” към ИБФБМИ-БАН. Представила е всички необходими документи, за да бъде допусната до защита на дисертационния си труд.

Представената ми за рецензия работа е свързана с една изключително актуална научна област, а именно разработване на нови методи за диагностика и последващо мониториране на терапевтичния ефект при онкохематологични заболявания. Чрез прилагането на нови методи и подходи за прецизно характеризирание и сравняване на кръвния протеом от здрави донори и пациенти с онкологични заболявания се цели постигане на клинично приложение на персонализирана терапия.

Дисертацията е написана на 132 стандартни страници. Включва въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, обобщение, изводи, справка за научните приноси и литература.

В литературния обзор систематично са разгледани онкохематологичните заболявания, обект на изследването. Представени са молекулните и генетични характеристики, симптомите и методите за диагностика и стадиране на мултиплия

миелом (ММ) и Валденщтрѳом макроглобулинемия. Разгледана е автоложната трансплантация на стволови клетки, като един съвременен и успешен метод за подобряване на качеството на живот при пациенти диагностицирани с малигнени заболявания. Описани са албумин, имуноглобулините (IgG, IgM, IgA, IgD), белтък на БенсДжоунс (специфичен за ММ), β -2 микроглобулин диагностичен и прогностичен фактор при ММ, парапротеини, представляващи основните плазмени белтъци с диагностично значение. Обърнато е внимание на клиничните методи свързани с идентифициране на протеини от кръвния серум - капилярната електрофореза; определяне на клоналност чрез Heavylite test и Freelite test, флуоресцентна диагностика. Специално внимание е обрнато на диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) като един прецизен метод за изучаване на енергетиката на температурно-индуцирани конформационни преходи в биомакромоллекули и нейно актуално приложение едва от 2007 година като метод за анализ на кръвна плазма, последваща диагностика и стадиране на онкологични заболявания.

Представеният литературния обзор е написан точно и ясно. Много добро впечатление прави богатата и изключително актуална литературна справка (почти всички цитирани източници са след 2000 година), както и факта, че в литературния обзор са намерили място предходни изследвания на групата, в която докторантката е работила своята дисертация.

Главата е илюстрирана с 24 фигури, повечето коректно цитирани (не е посочен източник за фигури 15, 23, 24).

Целта на настоящия дисертационен труд е да се разработи нов, неинвазивен подход и да се диференцират калориметричните маркери за диагностика, мониториране и оценка на клиничния статус на пациенти с ММ и ВМ, подложени на автоложна трансплантация на стволови клетки и нетрансплантирани пациенти по време на лечението им.

За постигането на така формулираната цел са поставени четири конкретни задачи.

Използваните в дисертационния труд методи са актуални и адекватни на поставените цел и задачи.

Резултатите и дискусията са представени в една глава, което значително улеснява четенето.

Представянето на резултатите започва с определяне на термодинамични параметри от термограмите на 21 здрави донори, използвани в последствие като контролни. Определени са характерни калориметрични стойности като температура на преходите на денатуриране на албумин и имуноглобулини, както и техните специфични топлинни капацитети. Пресметнати са отношенията c_p^{HSA}/c_p^{Igs} , средния център на тежестта на термограмата, както и енталпията на денатурация. Данните са в съответствие с тези получени от други автори.

В глава 2 са представени същите термодинамични параметри, но получени от кръвен серум на пациенти диагностицирани с IgM гамопатии. Имунологичните характеристики и брой пациенти разпределени по групи са представени в таблица 1. На фигура 27 са показани резултатите разпределени в три калориметрични групи на база на c_p^{HSA}/c_p^{Igs} . На база получените резултати са отчетени четири тенденции. Разпределението на броя пациенти по групи не е хомогенно. Най-голям брой пациенти 47.5% попадат в групата IgM2₁. Направено е заключение, че както секреторните, така и несекреторните типове MM и WM не показват единен типичен профил, което се приема като доказателство за диагностичния потенциал на ДСК.

Определена е корелация между имунологичните характеристики и термодинамичните параметри на калориметричните групи. Процентната концентрация на М протеин и албумин силно повлияват специфичния топлинен капацитет на температурния преход на глобулините (фигура 30).

В глава 3 се прави проследяване на ефекта от лечението при пациенти с MM и WM като се сравняват калориметричните характеристики на кръвния серум. Пациентите се проследяват за време от 5 до 20 месеца. Установява се, че в началото на изследването пациентите имат профили драстично отличаващи се от тези на здравите донори (фигура 31). За всички проследени пациенти прогресията на заболяването се свързва с промяна на формата на термограмата (фигура 32), като след анализ на връзката на кръвните нива на М протеин и калориметричните характеристики е установено, че намаленото ниво на серумен М протеин е свързано с промяна в термограмите в посока доближаване до контролните такива. Установяват се и леки отклонения от тази зависимост, което се обяснява с наличието на съпътстващи

заболявания при наблюдаваните пациенти. При един от изследваните пациенти $^L\text{IgM}_{p6}$ липсва корелация между съдържанието на М протеин и калориметричните параметри, но този случай се характеризира със специфичен тип термограма, нерегистрирана до сега (при него се отчита минимално намаляване в концентрацията на М протеина). Установена е корелация между метричното сходство ρ и средния център на тежестта на термограмата от една страна и концентрацията на моноклоналните IgM протеини и dHLC, което отразява клиничния статус на пациентите.

За проследяване на динамиката на изменение на калориметричните параметри при пациенти със секрция на моноклонални свободни леки вериги и на пациенти с несекретиращ миелом са изследвани съответно един и 10 пациента. Резултатите са представени на фигура 35 и 36.

Автоложната трансплантация на стволови клетки е процедура, която позволява да се проведе високодозово противотуморно лечение. Проследяване на ефекта от автоложната трансплантация при пациенти с MM е представено в глава 4.

Разгледано е състоянието на 8 пациента със секреторен MM, двама с несекреторен MM и един с FLC MM. Клиничните характеристики са представени в таблица 5. Показано е, че термограмите на всички пациенти получени преди прилагането на автоложна трансформация силно се отличават от тези на здравите контроли (фигура 37).

Бих искала да попитам дали представените термограми на пациентите преди автоложна трансформация са снети след прилагане на химиотерапия или непосредствено след диагностицирането на пациентите с онкохематологично заболяване, преди да е приложено каквото и да е лечение?

Много интересен е факта, че част от пациентите, а именно: $^T\text{IgA}_{p2}$, $^T\text{IgA}_{p3}$, $^T\text{IgA}_{p4}$, $^T\text{IgG}_{p1}$, първоначално са диагностицирани като секреторни, а непосредствено преди трансплантацията или не се откриват серумни М протеини или те са в много ниски концентрации, което показва, че в хода на изследването заболяването преминава от секреторна форма към несекреторна, което се потвърждава и от получените термограми.

Установен е различен ход на промяната на секрция на М протеина преди и след прилагане на автоложната трансплантация. При двама от пациентите нивата на М

протеина постепенно намаляват през целия период на мониториране, докато при други се наблюдава спад, а в последствие рязко повишаване на нивата най-силно изразена при $^T\text{IgA}_{p1}$.

Изследван е и ефекта на автоложна трансплантация на хемопоеетични стволови клетки върху пациенти с несекреторен мултипен миелом. Калориметричните им профили показват силно отклонение от тези на здрави донори, макар в кръвния им серум да не се секретират М протеини. Обща характеристика за проследените пациенти е разцепване на албумина непроменено и след прилагането на АТСК. Въпреки, че имунологичните параметри на пациентите са в норма, което говори за ремисия (фигура 41).

В последната пета глава на раздел резултати и дискусия е представено сравнение на два подхода за диагностика на малигнени състояния, а именно термодинамичния и този на база на флуоресцентните характеристики на серумния NAD(P)H. NAD(P)H е основен флуорофор в кръвния серум и намаляването на неговата флуоресценция се приема като показател за малигнено заболяване (флуоресценцията на NAD(P)H, отчетена с подходяща апаратура, от кожата на пациенти с туморни лези се използва като неинвазивна биопсия за диагностициране и проследяване на ефекта от терпията на базоцелуларен карцином, спиноцелуларен карцином и дори меланом). Установено е, че съотношението между емисията при 470nm и 400nm е показател за малигнено заболяване. Изследвана е група от 52 пациента и 10 контролни случая, като се установява голямо стандартно отклонение при групата на пациентите. Проведеният статистически анализ посочва много по-ниска чувствителност в сравнение с имунологичните и калориметричните методи за диагностика.

Бих искала да попитам за целите на флуоресцентния анализ и диагностика на пациентите кога и как са събирани кръвните проби и как е проведено флуориметричното изследване? Кръвта събирана за целите на калориметричните изследвания по същия начин ли е събирана, обработвана и съхранявана?

Като резултат от проведените експерименти са формулирани пет извода, които напълно съответстват на резултатите представени в дисертационния труд.

Поставените цел и задачи в дисертационния труд са изпълнени успешно.

Приносите имат характер на получаване на нови за науката факти.

В цитираната литература са включени 127 източника, повечето от тях публикувани след 2010г.

Заключение

Дисертацията на Августина Данаилова е написана на правилен и чист български език, балансирана е и оформена е много добре. Дисертантката е изпълнила голям обем работа. Съдържанието на автореферата и дисертацията съответстват.

Към дисертационния труд са приложени четири научни публикации, в две от които докторантката е първи автор. Две от статиите са в списания с импакт фактор, което обаче не отбелязано, а би било добре т.к. списанието *Thermochimica Acta* е с висок импакт – 2.238. Приложен е и списък със забелязаните цитати на една от публикуваните през 2015г. статия. Представен е списък с участията в научни форуми 7 на брой, както и участие в един научен проект.

От приложените документи става ясно, че докторантката е изпълнила всички изисквания на ЗРАС (успешно положени изпити, предварително разглеждане на дисертационния труд на разширен научен семинар, публикации с импакт фактор във връзка с дисертационния труд).

Всичко казано до тук, както и личните ми впечатления от докторантката ми дава основание убедено да препоръчам на научното жури да присъди на Августина Красимирова Данаилова образователната и научна степен „доктор”.

София

05.01.2018г.

Рецензент

доц. д-р Биляна Николова