

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен "доктор",
област на висше образование: "Природни науки, математика и информатика",
професионално направление: "Биологични науки", научна специалност: "Биофизика"

Автор на дисертацията: Августина Красиминова Данаилова, редовен докторант към
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН

**Тема: "Калориметрични маркери за диагностика и мониториране на
онкохематологични заболявания"**

Рецензент: Чл. кор. проф. дбн Здравко Иванов Лалчев

В дисертационната работа на Августина Данаилова са извършени изследвания с цел да се разработи нов подход, на базата на диференциална сканираща калориметрия (ДСК), за диагностика, оценка на клиничния статус и мониториране на пациенти с онкохематологичните заболявания мултиплен миелом (ММ) и Валденщрьом макроглобулинемия (ВМ), на такива подложени на автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки (АТСК) и на нетрансплантирани пациенти по време на лечението им.

През последните години ДСК се прилага успешно за изследване на серумни протеини в норма и патология, чрез проследяване на температурно-индуцираните им конформационни преходи, които зависят силно и от взаимодействията им с лиганди, потенциални биомаркери и др.

Поради присъствието на множество протеини в кръвния серум с припокриващи се калориметрични преходи се получават комплексни ДСК термограми, при което в литературата е установен типичен термодинамичен профил за здрави индивиди. Този профил се променя значително и специфично при пациенти с характерни заболявания и може да бъде използван като калориметричен маркер за диагностиката им.

Основните задачи в труда са да се изследват ДСК термограми на кръвни серуми от пациенти с ММ и ВМ и определят калориметричните маркери, които впоследствие се приложат за оценка на състоянието на пациенти в хода на лечение; да се оцени потенциала на ДСК подхода за оценка на ефектите от АТСК и да се сравни динамиката на промените на калориметричните параметри при трансплантирани и нетрансплантирани пациенти (диагностицирани с ММ) с тази на имунологичните маркери.

Явно е, че поставените цели и задачи в дисертационния труд са изключително важни

за молекулярната биология и медицината и че актуалността на проблема разработван в дисертацията, за въвеждане на нови калориметрични маркери за онкозаболяванията, е безспорна.

Поради хетерогенната природа на заболяването, ММ протича както без секреция (NS ММ), така и със секретирането на моноклонални (М) имуноглобулини (Igs) и моноклонални леки вериги, поради което ММ се характеризира с набор от калориметрични профили (групи) в зависимост от концентрацията на Igs и техните изотипове (IgG, IgA, IgM, IgE и IgD), което налага разработване на калориметрична класификация на ММ.

Измененията в термограмите на основните серумни протеини на пациенти с ММ са определяни чрез измененията на температурата на денатурация (T_m), специфичния топлинен капацитет на температурно-индуцираните преходи (C_p), енталпията на денатурация (ΔH) и средния център на тежестта на термограмата (T_{FM}). За анализ на резултатите е приложен алгоритъм за класифициране на ДСК профили с определянето на метрично разстояние (P) и коефициент на корелация (r), комбинацията между които дава "метричното сходство" (ρ), което може да се използва за класифициране на неидентифицирани термограми спрямо дадена референтна група.

Дисертацията съдържа 133 страници, 45 фигури и 7 таблици. Библиографската справка включва 11 и 1/3 страници, без номерация на източниците, с основно чуждестранни източници през последните 10 години. Тя е оформена по общоприетия начин и се състои от 9 части – въведение, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, обобщение, изводи и справка на приносите, цитирана литература и приложение. Приложението, което представлява перфектно документиране на резултатите, съдържа 23 фигури, всяка включваща серия от калориметрични профили при мониториране на различни случаи (до 20-ти месец) и респективно 23 таблици, представящи сравнение на калориметричните и имунологични параметри за всеки случай.

В литературния обзор (45 стр.) са разгледани подробно въпросите за ММ и Валденщрьом макроглобулинемията, автоложната трансплантация на стволови клетки, основните плазмени белтъци с диагностично значение за ММ, определяне на клоналност, ДСК като метод за анализ на кръвна плазма/серум, идентифициране на протеини в кръвния серум посредством капилярна електрофореза, върху приложението на флуоресцентните методи за диагностика на малигнени състояния и др. Обзорът прави много добро впечатление, той е добре систематизиран, съответства изцяло на целите на дисертацията и е свидетелство за задълбочените познания на докторантката в тази област.

Целите и задачите са ясно формулирани. Същото може да се каже и за раздела "Материали и методи". Използваният методичен арсенал е адекватен и достатъчен за

решаването на поставените цели и задачи.

В раздел "Резултати и дискусия" (32 стр.) са описани изследванията върху термодинамичните параметри на серумен протеом от здрави индивиди и такива от пациенти, диагностицирани с мултиплен миелом със секрция на IgM и BM; описани са данните от мониториране на пациенти с мултиплен миелом по време на лечението им и от мониториране на пациенти с мултиплен миелом подложени на автоложна трансплантация на стволови клетки. Направено е сравнение на термодинамичния подход и метода за диагностика на малигнени състояния на базата на флуоресцентни характеристики.

Получени са редица оригинални резултати, от които бих отбелязал по-важните:

1. Характеризирани са калориметричните профили на пациенти, диагностицирани с IgM MM и BM, като е демонстрирано сходството в техните термограми и е представена калориметрична класификация. Детектирана е промяната им в хода на лечение на пациентите, като е показано, че коефициент на корелация r може да бъде използван като маркер за прогресията на заболяването.

2. Установена е корелация между измененията на калориметричните маркери и тези в нивата на основния имунологичен маркер (M протеините) при пациенти със секрция на IgG и IgM, и липса на корелация с нивото на свободните леки вериги.

3. Демонстрирана е адекватността на ДСК подхода за мониториране на MM пациенти след автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки в хода на лечението им, за идентифициране на периоди на ремисия и повторна поява на заболяването. Идентифицирани са калориметрични маркери за проследяване ефекта на лечение.

4. Установено е при проследяване на трансплантирани пациенти с различен изотип MM, MM със секрция на свободни леки вериги (както и NS MM), че промените в термограмите на пробите от различни пациенти преди лечението и през периода на мониториране отразяват адекватно отговора на отделните пациенти на приложеното лечение. Показано е, че формата на термограмите, позицията на главния ендотермичен преход, центърът на тежестта на термограмите и появата на преход под 60 °C могат да бъдат използвани като калориметрични маркери.

5. Показано е, че с натрупването на M протеини коефициентът на корелация r намалява, а центърът на тежестта на термограмите T_{gm} нараства (което се очаква), като зависимостите са сходни както при трансплантирани, така и при нетрансплантирани пациенти със секреторен MM. При случаите на несекреторен миелом калориметричните маркери са отлични от стойностите за здрави индивиди, но не корелират с имунологичните (отношение на κ/λ свободни леки вериги, албумин и $\beta 2$ -микроглобулин), т.к. последните се

запазват в норма по време на мониторирането на пациенти с несекреторен миелом.

6. Установено е, че калориметричните маркери превъзхождат по чувствителност метода базиран на NADP(H) флуоресценция за детекция на ракови заболявания.

Получените резултати са правилно отразени във формулираните 5 извода и 4 приноса на дисертацията, които приемам.

Разделът "Обобщение" прави много добро впечатление. Направен е анализ на собствените резултати от който личи, че докторантката е способна да прави задълбочена интерпретация на научни резултати и е достигнала до зрялост в развитието си като изследовател.

Към оформянето на дисертацията могат да бъдат направени много малко забележки, въпреки че не липсват някои печатни грешки, които биха могли да се избегнат; в "Приложението" би било добре да се илюстрират електрофореграми от капилярната електрофореза; неточно на два пъти е описано разреждането на пробите за флуоресцентните изследвания и др. Тези дребни неточности в никакъв случай не развалят много доброто общо впечатление от стила на докторантката. Това впечатление се създава и от коректното и ясно описание на получените експериментални резултати.

Авторефератът съответства по съдържание на дисертацията. Списъкът на публикациите по темата на дисертацията съдържа 3 публикувани научни статии; 1 в българско списание и 2 в специализирано международно списание (Thermochimica Acta) с импакт фактор. В две от публикуваните статии А. Данаилова е първи автор. Един ръкопис на статия е изпратен за публикуване в международно списание. Забелязани са два цитата на статия от 2015 г.

Тази дисертация на А. Данаилова е доказателство за значителния напредък който тя е направила като бивша студентка на Биологическия факултет на СУ "Св. Кл. Охридски". Разбира се, тя е имала шанса да попадне в секция на ИБФБМИ, с ръководители проф. С. Танева и доц. С. Крумова, където изследванията със диференциална сканираща калориметрия традиционно са поставени от дълги години и има натрупан голям опит и престиж у нас и в чужбина.

Заклучение:

Приемам изводите и приносите, както са формулирани в дисертацията, като добре обосновани от експерименталните данни и интерпретирани професионално.

Като цяло, дисертационната работа допринася за разкриване потенциала на диференциалната сканираща калориметрия в случаи на важни и социално значими онкохематологични заболявания. В дисертационния труд са получени съществени и

оригинални научни резултати и факти, които имат потенциал за бъдещо приложение в медицината за диагностика и мониториране на една от най-често срещаните хематологични неоплазии - мултиплен миелом. Докторантката се е справила успешно с големия обем работа и трудната интерпретация на експерименталните резултати и е написала дисертационния труд на високо професионално ниво.

Поради всичко гореизложено, както и поради факта, че качествата на дисертацията задоволяват напълно изискванията на вътрешния Правилник на Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН, произтичащ от ЗРАС в РБ, убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури присъждането на Августина Красимирова Данаилова на образователната и научна степен "доктор".

01.02.2018 г.

Чл. кор. проф. дбн З. Лалчев: