

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р **Янчо Цеков Тодоров**, отдел „Генетика, развъждане, репродукция и биотехнологии на селскостопанските животни“ към Институт по животновъдни науки – Костинброд, Селскостопанска академия

**Относно:** Дисертация на тема „Изолиране и характеризиране на овариални стволкови клетки“, представена от Надя Емилова Петрова, за присъждане на научната и образователна степен „доктор“, в професионално направление 6.3 „Животновъдство“, специалност „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“, шифър 04.02.01.

**Информация по процедурата:** Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита по предложение на секция „Биотехнологии и криоконсервация на гамети“ към Институт по биология и имунология на размножаването - БАН. Процедурата е приета и журито е утвърдено на Научен съвет на ИБИР. Представени са всички необходими документи, свързани с докторантурата. Смятам, че са спазени всички изисквания на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

**Кратки биографични данни на кандидата:** Надя Петрова е родена през 1983г.. През 2006г. получава образователната степен „бакалавър“ по специалност „Биология и химия“, а през 2009г - „магистър“ по специалност „Клетъчна биология и патология“ в СУ „Климент охридски“. От 2009г. работи като асистент към ИБИР – БАН и като ембриолог в Ин витро АГ Център Димитров. През 2010г. е зачислена в докторантура редовна форма на обучение към ИБИР-БАН. Притежава сертификат за участие в 2<sup>nd</sup> Black Sea International Immunology School и за практически курс по флоуцитометрия. Омъжена, с две деца.

**Актуалност на дисертационната тема:** Безплодието (стерилитетът) е важен медико - социален проблем, засягащ 10-12% от двойките в репродуктивна възраст. Сред основните фактори за женски стерилитет е

намаленият яйчников резерв при пациентки в напреднала възраст или такива, преминали курс на химио / лъчетерапия. При тях се наблюдава липса на ооцити, отклонения в оплождането и/или развитието на предимплантационните ембриони. Развитието в областта на стволовите клетки дава надежди за много жени да се сдобият с дете. Тези неспециализирани популации могат да се самообновяват или диференцират в нови клетъчни линии като този баланс се поддържа от сложна мрежа от вътрешни (напр. ядрени транскрипционни фактори) и външни фактори (междуклетъчни контакти, растежни фактори и др.).

През последните години в научната общност започнаха бурни дебати по отношение на съществуването на овариалните стволови клетки. Тези неспециализирани популации биха могли да се използват както за получаване на нови яйцеклетки, така и за моделни системи за тестване на медикаменти, изясняването на сложни процеси и др. Откриват се нови възможности за жените, които имат репродуктивни трудности, особено в случаите на намален яйчников резерв, преждевременна яйчникова недостатъчност (POI), свързани с възрастта овариални дисфункции, както и пациентки преминали курс на лъче-/химиотерапия след прекарано онкологично заболяване. Темата е от значение както за хуманната медицина, така и за животновъдството и екологията, тъй като биха могли да се изготвят протоколи за *in vitro* получаване на яйцеклетки на ценни или изчезващи видове. Въпросът е актуален, но и дискуссионен и налага допълнителни по-задълбочени изследвания. Дисертационният труд е посветен на изследване за възможностите за изолиране на стволови клетки от яйчници, тяхното култивиране и криоконсервация. Подобен род проучвания са важни както за науката, така и за клиничната практика.

### **Анализ и оценка на дисертационния труд**

**Структура:** Дисертационният труд е написан на 121 страници. В библиографския списък са цитирани 161 литературни източника, от които 4 на кирилица и 157 на латиница. Дисертационният труд е написан на 131 печатни страници и структуриран, както следва: Въведение - 2 стр., Литературен обзор - 34 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материали и методи - 11 стр., Резултати и обсъждане - 31 стр., Заключение - 2 стр., Изводи - 1 стр., Приноси - 1 стр., Списък на използваната литература - 12 страници и шест Приложения. Структурата на дисертацията съответства на общоприетите изисквания и е онагледена с 28 фигури и 8 таблици.

**Въведение:** Във въведението кандидатът разглежда актуалността на проблема, като обосновава необходимостта от провеждането на проучванията, залегнали в основата на дисертационния труд.

**Литературен обзор:** Обзорът е обширен, като изчерпателно обхваща всички аспекти на проблема и дава информация, която обслужва избраната научна тема и има приносен характер. Той включва подраздели, описващи структурата и функциите на яйчника, регулацията на овогенезата, ендокринните функции на яйчниците. С оглед тематиката на дисертационния труд, голяма част от обзора е посветен на стволите клетки, техните видове, специфичната им микросреда (ниша), използването на стволите клетки в репродуктивната биология и изолирането на стволови клетки от яйчниците. Посочени са общите характеристики на стволите клетки, подробно са описани различните видове, нишите им и приложението им в репродуктивната биология. Посочени са дискусиите в исторически план, както и дебатите относно съществуването на стволови клетки в яйчници на зрели индивиди. Въз основа на набелязаните в обзора проблеми, авторът обосновава целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

Обзорът е онагледен с 4 подходящо подбрани фигури и 3 таблици, което го прави по-разбираем и лек за възприемане.

**Цел и задачи:** Целта на настоящата дисертационна работа е да се установи наличието на стволови клетки в яйчника и да се направят опити тези клетки да се характеризират. За изпълнение на поставената цел авторът разработва 6 задачи, които са достатъчно ясно и точно формулирани.

**Материали и методи:** Изследванията са проведени в базата на ИБИР-БАН и Ин витро АГ Център Димитров. Овариалната тъкан от 71 жени е получена в МБАЛ „Софиямед“, Университетска болница СБАЛАГ „Майчин дом“ и МБАЛ „Доверие“ чрез лапароскопия или мини лапаротомия през фоликулярната фаза на цикъла при планови операции на пациентите.

Овариалните гранулозни клетки са получени от 43 пациентки, участващи в програмите за асистирана репродукция в Ин витро АГ Център Димитров. За целта е извършена трансвагинална пункция на фоликулите на яйчника под ултразвуков контрол и под краткотрайна седация или локална

аналгезия. Изследователският материал е използван след получаване на информирано съгласие от страна на пациентите и в съответствие с действащото законодателство.

Освен от човешки яйчници са използвани овариални тъкани от зайци и плъхове.

В експериментите са използвани широка гама методи за изследване: микроскопия, флоуцитометрия, ко-култивиране, криоконсервация, трансплантация на човешка овариална тъкан върху мишки и др. Методиките са описани много ясно и подробно, което позволява възпроизвеждане на експериментите. Използването на съвременна апаратура, среди и консумативи на водещи фирми-производители гарантира достоверността на получените резултати.

**Резултати и обсъждане:** Получените от автора резултати най-общо могат да се разделят в три групи:

*Получаване и култивиране на овариални клетки*

Изолирани са първични клетъчни култури и са характеризирани овариалните култури. Проследени са темповете на развитие на културите и морфологията на клетките включително и след оцветяване с хематоксилин - еозин. С цел оптимизиране на условията за култивиране са изследвани различни среди. Виталитета е отчитан след оцветяване с трипанблау. Въз основа на получените резултати са определени две среди (DMEM/F12 и Leibovitz), които са най – подходящи за култивиране на човешки и животински овариални клетки. Макар получените резултати в този раздел да са по-скоро с потвърдителен характер, те са важни както в чисто научен аспект, така и за клиничната практика.

Изследвано е влиянието на FSH (фоликулостимулиращ хормон) върху пролиферацията на овариалните клетки. Установено е статистически достоверно влияние и е установена най – подходящата доза FSH.

Изследвана е също така и функционалната активност на овариални клетки от смесена култура след ко – култивиране с изолирана фракция на човешки сперматозоиди. Потвърждава се, че ко – култивирането в клетъчна култура подобрява преживяемостта и подвижността на мъжките гамети.

Проведени са и сравнителни изследвания върху методите за криоконсервация на овариални клетки.

Клетките са разделени на четири групи, конвенционално замразяване, програмно замразяване, витрификация и контрола.

Най – добри резултати са получени при витрификация и програмно

замразяване.

Проведено е също така култивиране и криоконсервация на овариални фрагменти. Размразени фрагменти са трансплантирани на имунодефицитни мишки. Резултатите от изследване за апоптоза 45 дни по - късно показват, че близо 60% от клетките са витални.

*Изследване наличието на мезенхимни стволкови клетки в яйчника*

Установено е след флоуцитометричен анализ, че популация от смесените култури, както и от гранулозната култура експресират позитивните антигени CD73, CD90 и CD105 и че около 6-8% експресират отрицателните антитела CD45, CD34. Установено е, че количествената експресия на мезенхимни стволковклетъчни маркери силно се влияе от участъка от който са изолирани клетъчните популации (кортекс, медула и пр.).

Проведени са експерименти за индуциране на диференциация на овариални клетки от смесена и гранулозна култура. Осъществена е насочена остеогенна диференциация чрез култивиране на овариалните клетки в среда, обогатена с дексаметазон, глицерофосфат и аскорбинова киселина.

След култивиране в среда, насочваща към адипогенна диференциация след оцветяване с Oil-Red, в цитоплазмата на някои от клетките е установено наличието на липидни вакуолки в червен цвят както при смесената овариална култура, така и в гранулозните култури от фоликулярни аспири, които липсваха в отрицателните контроли.

За предизвикване на неврогенна диференциация, клетките са инкубирани за една седмица с Neurogenic Differentiation Medium (Promo Cell), клетките са оцветени с Cresyl violet и е установено наличие на нислова грануляция, която е характерна за клетки с невроподобен фенотип.

Чрез флоуцитометричен анализ с Human and Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit (Becton Dickinson) (*Приложение 5*) и Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (Becton Dickinson) (*Приложение 4*) е изследвана експресията на плурипотентни маркери от овариални клетки (Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4. Резултатите от проведените експерименти показват, че някои от клетките на яйчника са позитивни, макар и в различна степен, за Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4. За контрол са използвани човешки ESC.

Интересно е изследването свързано с възрастта на пациентките. Докторантът посочва, че в културите, получени от всички възрастови групи, има клетки, които експресират в различна степен всички изследвани

плюрипотентни маркери (Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4), като е наблюдаван значителен спад в нивата на петте молекули с напредване на възрастта. Клетките, получени от пациентки в менопауза, са положителни само за два маркера (SSEA-4 и Sox2).

Доказателственият материал в дисертационния труд - снимки на микроскопски препарати, данни от флоуцитометричен анализ, от култивиране и др. е с много високо качество. Приятно впечатление прави отличната статистическа обработка и представянето на резултатите в таблици и графики. Докторантът е показал умение не само да тълкува собствените резултати, но и да ги съпоставя с данните, получени от други автори, което свидетелства за отлично познаване на материала.

**Изводи и приноси:** От извършените изследвания са направени 5 извода, които приемам, и са формулирани четири приноса, два от които с потвърдителен характер и два с оригинален. Изводите коректно отразяват получените резултати.

**Литература:** Приложен е библиографски списък от 161 заглавия, от които 4 на кирилица. 110 от източниците са от последните 10 години. Те са цитирани коректно там, където трябва, съобразно задачите на дисертационния труд.

**Публикации във връзка с дисертационния труд:** Кандидатът е представил 7 публикации, от които в две е първи автор и са свързани непосредствено с дисертационния труд, което е индикация за активното и участие в проведените изследвания. а другите пет са в съавторство, но имат пряко отношение към темата. Резултатите са представени и на няколко научни форума под формата на постери и доклади.

**Автореферат:** Авторефератът (42 страници) е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

**Критични бележки:** На места литературният обзор е прекалено подробен, в някои подраздели информацията би могла да бъде представена в по-концентриран вид, но това е характерно за повечето дисертации.

Подробно е описан строежа на яйчника, хормоналните функции, фоликулогенеза и пр. Може би тези данни трябваше да се предадат през

призмата на стволите клетки.

Към раздела „Материали и методи“ нямам забележки. Методиките са описани подробно, но това е полезно за провеждане на паралелни проучвания в други лаборатории.

Лично аз смятам, че частта с ко – култивирането на подвижни сперматозоиди с клетъчните култури е встрани от целта на изследванията. Положителното влияние на ко – култивирането с клетъчни култури е изследвано много интензивно през годините и в случая не виждам връзката със стволите клетки.

Следва да се отбележи, че направените от мен критични бележки са от техническо естество и в никакъв случай не омаловажават достойнствата на представения ми за рецензия дисертационен труд.

**Лични впечатления от кандидата:** Познавам кандидата от работата и като ембриолог в Ин витро АГ Център Димитров и като член на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология. Смя да твърдя, че Надя Петрова е висококвалифициран млад учен, владеещ съвременни методи за изследване и работа с гамети и ембриони. Ползва се с уважение от колегите, с които работи. Смятам, че нейната докторантура е един прекрасен пример за колаборация между наука и клинична практика в областта на медицинската биология.

**Заключение:** Представеният дисертационен труд на Надя Петрова е актуален от научна и практическа гледна точка. Налице е добър баланс в структурата между отделните части на научния труд, с акцент върху обема на научните резултати и тяхното обсъждане. В тази връзка, достойнствата на дисертационния труд и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии съгласно ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на ИБИР-БАН - София, ми дават основание да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на Надя Емилова Петрова научната и образователна степен „ДОКТОР“ по специалност 04.02.01. „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“.

02.01.2020г.

Рецензент:

/доц. д-р Янчо Тодоров, DVM/