

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Бойко Георгиев, доцент към Институт по биология и имунология
на размножаването - БАН

на дисертационен труд на тема „Влияние на процеса на криоконсервация върху експресията на специфични маркери и потенциала за спонтанна и индуцирана диференциация на стволови клетки“, разработен от Марина Деянова Христова.

В последните години все по-голямо внимание се обръща на СК като основен инструмент за възобновяване, възстановяване или изграждане отново на увредени органи и тъкани в човешкото тяло, като от тук произтича и актуалността на дисертационният труд. Представената за рецензиране работа е написана на 125 стр., цитирани са 192 автора, от които 189 на латиница и 3 на кирилица, като по-голямата част са от последните 5 години. Има 34 фигури и 10 таблици, които онагледяват много добре представения материал.

Литературният обзор е 32 страници, представяйки актуалното състояние на въпросите, касаещи СК. Направена е детайлна характеристика на различните видове СК, както според потенциала им за диференциация - Тотипотентни, Плурипотентни, Мултипотентни, Олигопотенти, така и според източника на получаване - Ембрионални стволови клетки, Възрастни стволови клетки, Индуцирани плурипотентни стволови клетки, Мезенхимни стволови клетки, Хемопоеични стволови клетки. Представена е характеристика на имунофенотипните маркери на МСК (Stro-1, CD271, CD146, Ганглиозид GD2, CD349, SSEA-4, SSEA-3, CD49f, 3G5, SUSP2, CD200, CD56), както и имуномодулиращите им свойства. Подробно са характеризирани и хемопоеичните стволови клетки с техните маркери - CD34, CD133, CD33, CD13, CD2, CD5, CD7, CD10 и CD 19 и хематопоеичните растежни фактори - IL-1, TNF, SCF, Fit-L, IL-3, GM-CSF, IL-6, G-CSF, тромбopoетин.

Подробно са разгледани и въпросите относно криоконсервацията, като надежден метод за дълготрайно съхранение на СК с последващо

размразяване и използване за нуждите на регенеративната медицина. Отбелязани са и нерешените въпроси, свързани със съхранението на СК при ултраниски температури, дали повод за разработването на настоящия труд - кои методи (бавно замразяване, програмно замразяване, витрификация) и кои криопротектори (проникващи - диметилсулфоксид, глицерол, етилен гликол, пропилен гликол), както и непроникващи - захароза, трехалоза, фикол, поливинилпиролidon, хидроксиетил нишесте са най-подходящи за замразяването на СК с оглед запазване на тяхната способност за диференциация, експресия на специфични маркери и имуномодулиращи свойства.

Вследствие на задълбочения и обстоен литературен обзор логично е изведена **целта на настоящата работа**, а именно: да се изследва влиянието на процеса на криоконсервация върху експресията на специфични маркери и потенциала за спонтанна и индуцирана диференциация на мезенхимни и хематопоеични стволови клетки с оглед оптимизиране технологиите за замразяване и съхраняване на този вид биообекти. За така поставената цел автора е формулирал следните **основни задачи**:

1. Получаване, намножаване и стокиране на хемопоеични и мезенхимни стволови клетки;
2. Характеризиране на мезенхимни стволови клетки, изолирани от различни източници; Опити за насочена диференциация в остеогенно, адипогенно и неврогенно направление;
3. Изследване на възможността за използване на чФЧК като фидерен слой при култивиране на клетки, изолирани от вѝтреклетъчна маса на предимплантационни ембриони.
4. Характеризиране на хемопоеични стволови клетки, получени от умбиликална кръв;
5. Изследване влиянието на нискодозирани физични въздействия (микровибрации) върху потенциала за диференциация на ХСК.

6. Сравнителни изследвания на токсичността и криозащитния ефект на проникващи и непроникващи криопротектори върху мезенхимни стволови клетки;

7. Изследване токсичността и криозащитния ефект на криопротектори върху хематопоеични стволови клетки;

8. Изследване влиянието на процеса на криоконсервация върху морфологичните, имунофенотипните и функционалните показатели на стволовите клетки;

9. Сравнителни проучвания върху ефективността на различни методи за криоконсервация (включително витрификация) на МСК и ХСК.

Като **експериментален материал** са били използвани умбиликална кръв, мастна тъкан, ембриони на стадий бластоцист, както и МСК, получени от фетален черен дроб (абортен материал). Изолирани са били човешки фетални чернодробни клетки, мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан, хемопоеични стволови клетки (ХСК) от умбиликална кръв. За характеризиране на ХСК и МСК е използван флоуцитометричен анализ - (Human Mesenchymal Stem Cells Analysis Kit (BD Stemflow; отделни моноклонални антитела белязани с FITC, PE, PerCP: CD10, CD11b, CD13, CD14, CD34, CD38, CD45, CD56, CD61, CD62L, CD63, CD73, CD90, CD105, HLA-DR.), както и имунофенотипен анализ на ХСК - с използване на флуоресцентно белязани моноклонални антитела.

Морфологичният анализ на МСК е направен чрез оцветяване на клетъчната култура по метода на Май-Грюнвалд Гимза (МГГ) и с хематоксилин-еозин (ХЕ).

За диференциация на МСК са били използвани следните методи:

За адипогенна диференциация, МСК след достигане на 60-70% конфлуентност - култивиране в Complete MesenCult Adipogenic Medium за 14 дни.

Остеогенна диференциация - култивиране на клетките за период от 35 дни в Complete MesenCult Osteogenic Medium (Stem Cell Technologies).

Неврогенна диференциация - чМСК култивирани с Neurogenic Differentiation Medium (PromoCell) за 1 седмица.

Диференциация на ХСК - изолираните клетки са били култивирани в хранителна среда MethoCult medium за 12-14 дни.

Криобиологичните изследвания са били насочени към изследване токсичността и криозащитно действие на различни криопротектори върху виталитета на МСК и ХСК. Анализирано е действието и ефекта на някои често използвани в практиката криопротективни вещества (DMSO, етилен гликол, глицерол, Ficoll-PM 70) върху стволовите клетки, като е било приложено конвенционано замразяване, програмно замразяване и витрификация. Тестове за виталност са проведени чрез Оцветяване с Трипаново синьо и флоуцитометрия (с Annexin-5-FITC Apoptosis Kit).

Резултати:

Изолирани и култивирани са били чМСК от мастна тъкан и фетален черен дроб. Впоследствие е направен морфологичен и имунофенотипен анализ на изолираните МСК.

Според стандартите на Международната асоциация по клетъчна терапия, мезенхимните стволови клетки трябва да отговарят на определени минимални критерии: да адхезират към повърхността на лабораторния съд при култивиране; да експресират CD73, CD90, CD105 и CD44 и да не притежават повърхностни антигени на хематопоетичната линия CD45 и CD34, а също така и CD14 или CD11b, CD79 α или CD19 и HLA-DR; да се диференцират *in vitro* в поне две от следните клетъчни линии - остеобластна, адипоцитна и хондробластна .

При направения имунофенотипен анализ на чМТ-МСК е била установена положителна експресия на CD73, CD90 и CD105 и негативни сигнали за маркерите CD34, CD11b, CD45, HLA-DR .

При анализа на чФЧК е показано, че те притежават характеристики на МСК, като е наблюдавана положителна експресия за CD13, CD73, CD90 и CD105. От друга страна, не е била установена експресия на хематопоетичните маркери CD45, CD34 и HLA-DR. Също така, са отсъствали и мембранните антигени CD10, CD11b, CD14, CD38, CD56, CD61, CD62L, CD63. Независимо,

че при характеризирането на МСК не са използвани маркери като STRO-1 (разпознаващ нуклеирани еритроидни клетки), CD271/NGF R (използван за разграничаване на МСК от Хематопоеични), CD 200, Ганглиозид GD2, CD348 както и TNAP може да се приеме, че получените и изолирани клетки отговарят на характеристиките на стволови клетки и напълно отговарят за нуждите на експерименталната разработка.

Индуцирана диференциация на МСК е постигната както следва:

- Остеогенна диференциация: след 35 дневна инкубация в Complete MesenCult Osteogenic Medium е било установено характерно черно оцветяване, което е показател за натрупването на Ca_3PO_4 в извънклетъчния матрикс, като сходни резултати са били наблюдавани преди и след криоконсервация.

- Адипогенна диференциация: след двуседмична инкубация интрацелуларни липидни капки са били визуализирани чрез специфично оцветяване с Oil Red O, като не е била установена разлика в потенциала за диференциация при свежи и размразени клетки.

- Неврогенна диференциация: след едноседмична инкубация и оцветяване на клетките с Cresyl violet е било установено наличие на нислова грануляция (доказателство за невроподобен фенотип) при свежи и размразени клетки.

Показана е възможността за използване на чФЧК като фидерен слой при култивиране на чЕСК, като получените резултати показват, че чФЧК създават благоприятни условия за развитието на чЕСК. Те са запазили типичната за тях морфология на колониите (кръгли с гладки очертания) при продължително култивиране.

Криобиологични изследвания върху МСК

- Изследвана е токсичността и ефекта на различни криопротектори върху чМТ-МСК: най-висок цитотоксичен ефект е наблюдаван при пробите третирани с DMSO. Статистически значима по-ниска клетъчна жизнеспособност е била установена, дори след третиране с 5%-я разтвор ($p < 0.001$, в сравнение с контролите). Независимо от токсичното действие на DMSO е установено, че той проявява най-добър криозащитен ефект.

Сходни резултати са били отчетени при културите инкубирани с глицерол. Най-високата използвана концентрация (20%) на EG, DMSO, Gly има за резултат значително намаляване на пролиферативната активност на чМТ-МСК, в резултат на което плътен монослой не е бил формиран в продължение на 14 дни. Виталността на клетките при 20% Ficoll PM 70 е била редуцирана ($63.8\% \pm 3.1$), но при всички останали концентрации не са били отчетени значителни разлики в сравнение с контролите .

- При изследване влиянието на различни среди за криоконсервация върху чМТ-МСК е установено, че средата за криоконсервация съдържаща 8,5%DMSO+HES е най-благоприятна и процента виталност след размразяване е $92.3 \pm 0.8\%$.

- Сравнителни изследвания на различните методи за криоконсервация върху чМТ-МСК. От получените резултати се установява, че чМТ-МСК са криотолерантни и запазват сравнително висок процент преживяеност след всички изпитани методи за криоконсервация, но от използваните техники за криоконсервация на чМТ-МСК е установено, че програмното замразяване е най-ефективния метод за тяхното дългосрочно съхранение.

Хемопоеични стволови клетки

- Изолиране, култивиране и диференциация на ХСК от умбиликална кръв- След изолиране и култивирани в среда MethoCult™ medium (Methylcellulose-based media) са наблюдавани колонии в резултат на спонтанна диференциация на ХСК, а именно: CFU-E (Colony-forming unit-erythroid), BFU-E (Burst-forming unit-erythroid), CFU-G (Colony-forming unit-granulocyte), CFU-M (Colony-forming unit- macrophage), CFU-GM (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage), CFU-GEMM (Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte).

- Чрез имунофенотипен анализ на хематопоетични стволови клетки, изолирани от умбиликална кръв, с помощта на флуоресцентно белязани моноклонални антитела клас II е отчетено процентното съдържание на различните субпопулации CD34 клетки и среден процент CD34+ клетки в изследваната кръв - 0,41%.

- При култивиране на ХСК в условия на нискодозирани физични въздействия е установено, че колонии на клетките в условия на микровибрации се образуват и растат по-бързо, отколкото в контролата. Възниква въпросът защо само ХСК са подложени на тези въздействия?

Криобиологични изследвания върху ХСК

- Изследване токсичността и ефекта на различни криопротектори върху ХСК - най-слаб ефект върху виталитета и колонофирмиращата активност на ХСК е наблюдаван след инкубирането им с Fikoll. Под действие на глицерола е отчетено значително понижаване на жизнеспособността на клетките. Инкубирането на клетките с DMSO оказва най-негативно влияние, както върху техния виталитет, така и върху пролиферативната и CFU им активност. При изследване влиянието на различни среди за криоконсервация върху ХСК, най-добри резултати са наблюдавани при използване на среда съдържаща 10% DMSO+HES.

- При проведените сравнителни изследвания на ефекта на различни методи за криоконсервация върху ХСК, е показано, че конвенционалният протокол за криоконсервация води до най-неудовлетворяващи резултати – $54 \pm 2.4\%$ виталност след размразяване, стойност достоверно по-ниска от контролната проба ($94 \pm 1.4\%$). При програмно замразяване и витрификация е наблюдаван висок процент преживяемост, съответно $90 \pm 1.4\%$ и $83 \pm 2.1\%$. Недостатък на методът витрификация е, че използването му е подходящо само за проби с малки обеми. Размразените проби след програмно замразяване са били изследвани флоуцитометрично, като е отчетен висок процент жизнеспособни клетки – 91.1% (отрицателни за анексин V-FITC и пропидиев йодид). Апоптотични са били 5.9 % от клетките (положителни за анексин V-FITC и негативни за пропидиев йодид) и 1.5 % мъртви или в крайна фаза на апоптоза (положителни за анексин V-FITC и пропидиев йодид). В контролната проба са били отчетени 94% витални клетки. Оптималната скорост на охлаждане е $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Обсъждането и обобщаването на резултатите е обстойно и последователно, като направените **изводи** са логично следствие от задълбочения анализ на проведените експерименти и получените данни от тях. Най-важният извод, който е изведен на базата на прецизно

извършените опити е, че процесът на криоконсервация не оказва влияние върху морфологичните, имунофенотипните и функционални показатели на меземхимните и хематопоеичните стволови клетки, което точно отразява и целта на дисертационния труд. На тази основа съвсем коректно са изведени приносите на дисертацията, а именно: за първи път са приложени комплексни криобиологични изследвания върху човешки МСК и ХСК. Установено е, че криоконсервацията не влияе върху имунофенотипните показатели и способността за диференциация на МСК и е предложен метод за култивиране на ХСК в условията на микровибрации.

Дисертантът е изпълнил всички изисквания на ЦО на БАН относно кредитната система. Авторефератът коректно и точно представя резултатите по дисертационния труд и е оформен съгласно предписанията.

Марина Христова завършва Молекулярна биология в Софийския университет с бакалавърска степен през 2012г., а през 2014 г. завършва магистърска програма Биология на развититето. От 2014 г е асистент в секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“, а от 2015 г. редовен докторант към секцията. Има 9 научни публикации, от които 2 с импакт фактор, 17 участия в научни форуми и 3 участия в проекти.

В заключение, с удоволствие бих препоръчал на Марина Христова да бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ по специалността „Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17.

Дата:

Подпис:


/доц. Бойко Георгиев/