



СТАНОВИЩЕ

на доц. Пламен Тодоров, дб, от ИБИР-БАН,

Относно: дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен доктор по специалност „Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17., представен от Марина Деянова Христова

на тема *„Влияние на процеса на криоконсервация върху експресията на специфични маркери и потенциала за спонтанна и индуцирана диференциация на стволови клетки“*

Информация за кандидата

Марина Христова завършва Биологическия факултет към СУ през 2012г., специалност „Молекулярна биология“. Впоследствие изготвя дипломна работа по магистърска програма „Биология на развитието“, която отлично защитава и придобива квалификацията „магистър“. От януари 2015г. е зачислена като редовен докторант към ИБИР-БАН. Има общо 9 научни публикации, 4 от които са непосредствено свързани с настоящия дисертационен труд (2 от тях са в списание с импакт фактор). Участвала е в работата на 17 научни форума, на 6 от които е представила резултати по дисертацията. Ръководител е на 2 научноизследователски проекта, финансирани по програма „Млади учени“.

Представеният дисертационен труд и съпътстващата документация съответстват на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, както и на допълнителните критерии на БАН и ИБИР за защита на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“

Актуалност на темата

Представеният ми за становище труд касае важни за медикобиологичната наука проблеми – задълбочаване на изследванията върху човешки стволови клетки и оптимизирането на методите за съхранението им. Към момента основните усилия в изучаването на стволовите клетки са насочени към тяхното характеризиране и оптимизиране на условията за култивиране и насочена диференциация. Малко се знае как факторите на процеса на криоконсервация влияят върху биологичните им свойства. Това обуславя актуалността на настоящата работа, както във фундаментален, така и в чисто практически аспект.

Структура, цели и методичен подход на дисертационния труд, анализ на резултатите

Дисертацията е написана на 125 страници и включва 34 фигури и 10 таблици. Структурирана е съгласно възприетите стандарти и се състои от Въведение – 1 стр., Литературен обзор от 32 стр., Цел и задачи на дисертационния труд – 2 стр., Материали и методи – 10 стр., Резултати и обсъждане – 41 стр., Заключение – 3 стр., Изводи и приноси – 2 стр. и Списък на използваната литература – 22 стр. Цитирани са 192 литературни източника, от които 3 на кирилица и 189 на латиница. Включен е и списък на 4 публикувани

от дисертанта статии и 6 участия в научни форуми, всичките във връзка с дисертационния труд.

Литературният обзор е балансиран като структура и съдържание. Състои се от две части. В първата докторантът дава подробна информация относно различните видове стволови клетки, възможностите за тяхното приложение и необходимостта от съхранението им. Във втория раздел са описани факторите, които имат ефект върху биологичните обекти в процеса на замразяване, третиранията за предотвратяване на неблагоприятните въздействия, както и използваните методи за криопрезервация. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с 9 фигури и 2 таблици. Представянето на разглежданите данни е ясно, направено е професионално и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания. Много добрият стил на изложение прави прочита на обзора, както и останалите части на дисертацията, лек и увлекателен. По-голямата част от цитираните работи са нови, от последните 5 години.

Мотивировката на настоящето проучване логично произтича от направения литературен анализ. **Целта** е формулирана точно и е прецизирана в девет **задачи**, които ясно очертават периметъра на проведените изследвания.

Като **изследователски материал** дисертантът използва човешки хематопоеични стволови клетки, изолирани от умбиликална кръв, мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан и абортен материал, и предимплантационни ембриони.

Методичният подход е адекватен на поставената цел и задачи и е изпълнен на много високо ниво. Дисертантът използва широк спектър методи за изследване – клетъчни култури, диференциация, криоконсервация, флоуцитометричен анализ и др. Протоколите са описани старателно и подробно, което позволява тяхната възпроизводимост и от други изследователи. Съвременната апаратура, с помощта на която са проведени изследванията, както и използването на висококачествени среди и консумативи от водещи световни производители гарантират достоверността на получените резултати.

Основна част по обем и по значимост в дисертацията е разделът **„Резултати и обсъждане“**. Получените експериментални данни са изложени и дискутирани в раздела в ред, който следва дефинираните задачи на дисертационния труд. Изолирани са два вида човешки мезенхимни стволови клетки (от мастна тъкан и фетален черен дроб). Клетките са детайлно характеризирани с помощта на проточна цитометрия, проследени са особеностите на растежа им при култивиране ин-витро. Установено е, че те успешно могат да бъдат диференцирани в остеогенно, адипогенно и невrogenно направление. Показана е възможността мезенхимните стволови клетки да бъдат използвани като фидерен слой за култивиране на човешки ембрионални стволови клетки. Сравнителните криобиологични изследвания (токсичност и криозащитно действие на различни криопротектори, различни техники за замразяване) свидетелстват, че като цяло мезенхимните стволови клетки са криотолерантни и могат успешно да бъдат криоконсервирани, като процесът не влияе върху

експресията на характерните за тях имунофенотипни маркери и способността им за диференциация след размразяване.

Детайлни проучвания (имунофенотипизиране, култивиране, криобиологични изследвания) са проведени и върху човешки хематопоеични стволови клетки, изолирани от пъпна връв. Резултатите показват, че те също се отличават с добра криотолерантност. Особен интерес представлява предложената от дисертанта техника за култивиране на хематопоеични стволови клетки в условията на микровибрации. Установено, че нискодозираното физично въздействие не влияе върху колоноформиращия потенциал на стволовите клетки и процентното съотношение на видовете получени колонии, но ускорява растежа на колонииите.

Получените данни са систематизирани, представени в графики и онагледени с достатъчно количество оригинални снимки и хистограми, потвърждаващи тяхната достоверност.

Считам, че всички представени резултати са лично дело на автора. Дискутирането им е на много добър научен език и професионален стил, и е изключително убедително.

В **Заключението** в обобщен и систематизиран вид са представени основните резултати от дисертационния труд и тяхното значение.

Правилно изведени и точно формулирани са 9 **извода**, които приемам изцяло. Те са конкретни, стегнато написани, отговарят на поставените задачи и отразяват адекватно получените резултати. Като оценявам високата теоретична и практическа стойност на представения труд, приемам напълно сформулираните от автора оригинални **приноси**, а именно:

- За първи път са проведени комплексни криобиологични изследвания върху човешки ХСК и МСК. Изследвани са токсичността и криозащитният ефект на използвани в практиката проникващи и непроникващи криопротектори и техни комбинации.
- Показано е, че процесът на криоконсервация не влияе върху имунофенотипните показатели и способността за диференциация на МСК.
- Предложен е метод за култивиране на ХСК в условията на микровибрации.

Афторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

В качеството си на завеждащ секция и научен ръководител ще си позволя да споделя и **лични впечатления** от работата на докторанта. Марина Христова постъпи на работа в ИБИР с много добра теоретична подготовка в областта на молекулярната и клетъчна биология. По време на магистратурата си, а впоследствие и докторантурата, усвои редица съвременни методи за изследване и криоконсервация на гамети, ембриони и стволови клетки. Освен задължителните и избираеми докторантски курсове, посети няколко допълнителни обучения по PCR (в Националната генетична лаборатория), флуоцитометричен анализ (в НЦЗПБ и Института по микробиология към БАН) и др.

Доказателство за добрата и подготовка е фактът, че е назначена на работа на допълнителен граждански договор като ембриолог в един от водещите в страната ин-витро центрове. Отличава се с колегиалност и умение за работа в екип.

Заклучение

Въз основа на гореизложеното, отчитайки научените и приложените от докторанта различни методи на изследване, правилно планираните и проведени експерименти, получените резултати, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, както и на препоръчителните критерии за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБИР-БАН, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Марина Христова образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност „Физиология на животните и човека“.

06.02.2018г.

Изготвил Становището:



/доц. П.Тодоров, дб/