



## РЕЦЕНЗИЯ

От проф. дбн Росица Конакчиева,

Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

върху дисертационен труд на тема: „Влияние на процеса на криоконсервация върху експресията на специфични маркери и потенциала за спонтанна и индуцирана диференциация на стволови клетки“, на Марина Деянова Христова, редовен докторант секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ - Институт по биология и имунология на размножаването – БАН за придобиване на ОНС "Доктор" в научно направление 4.3. Биологически науки (Физиология на животните и човека)

Рецензирането на материалите, представени в настоящата процедура, се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, на Заповед № 452 /14.12.2017г. на Директора на ИБИР-БАН за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания на ППЗРАСБ на БАН и ИБИР за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности. Докторантката Марина Христова е представила за процедурата по защитата всички необходими материали, справки и документи. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидатката.

### Биографични данни

Марина Христова се дипломира в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ като бакалавър по молекулярна биология през 2012г. През 2014 г. завършва магистърска програма Биология на развитието в БФ на СУ и защитава с отличие дипломната си работа. От 2014 г е асистент в секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“, а от 2015 г.е редовен докторант към секцията.

### Актуалност на разработвания проблем

Представеният за рецензиране дисертационен труд попада в интензивно развиваща се и перспективна област на биомедицинските изследвания – биология на мезенхимните и хемопоеични стволови клетки. В световен мащаб това е бурно развиващо се научно направление и настоящият труд е сериозна заявка за интереса и необходимостта България да се включи с принос в тази научно – изследователска сфера. Изследванията върху стволовите клетки са свързани с големи надежди за нови терапевтични подходи в здравеопазването: регенерация на тъкани и органи, перспектива за лечение на редица болести. Към момента в световен мащаб усилията са насочени основно върху разработването на нови методи за получаване, характеризирание, препрограмирание и насочена диференциация на СК от възрастни организми. Криобиологичните изследвания върху човешки СК са ограничени, като влиянието на процеса на криоконсервация върху основните характеристики на стволовите клетки както и ефективността на различни методи за замразяване остават непроучени.

Представянето на дисертационен труд върху сравнителни изследвания в тази посока е значително събитие за българската наука и отговаря на съвременните потребности на биомедицината в най-голяма степен.

В дисертацията са описани методи за получаване на стволови клетки от различни източници. Изолираните клетки са детайлно характеризирани и голям брой проби са стокирани за бъдещи изследвания. Авторката е установила, че изолираната адхезивна фракция клетки от мастна тъкан (чМТ-МСК) и фетален черен дроб (чФЧК) (абортен материал) съответстват на всички критерии на Международната асоциация по клетъчна терапия за МСК. След провеждане на имунофенотипен анализ тя представя доказателства, че чМТ-МСК и чФЧК експресират общоприетите CD73, CD90, CD105 и са негативни за антигените на хемопоеичната клетъчна линия. Клетките успешно са диференцирани в остеогенно и адипогенно направление, което е още едно доказателство за стволово-клетъчния им характер. Представени са доказателства и за невrogenна диференциация, което на този етап не може да бъде прието безусловно. Оптимизирани са условия за култивиране на ХСК чрез физично въздействия (микровибрации), което има значителна научно-приложна стойност предвид малкия брой клетки присъстващи в умбиликалната кръв. С цел оптимизиране на методите за криоконсервация е сравнено цитотоксичното действие и криозащитния ефект на някои широко използвани в практиката криопротектори и техни комбинации. Установено е, че етиленгликолят и глицеролът са по-слабо токсични от DMSO и за двата вида клетки (ХСК и МСК), но нямат нужния криопротективен ефект и не са подходящи за криоконсервация на този вид биообекти. В обобщение данните позволяват да се направи заключението, че човешки ХСК и МСК се отличават с добра криотолерантност и при използване на щадящи режими на охлаждане могат успешно да бъдат замразени и съхранени. Процесът на криоконсервация не влияе върху експресията на специфични за СК маркери, както и върху потенциала им за спонтанна и индуцирана диференциация.

#### **Обща характеристика на дисертационния труд**

Представената дисертация е организирана по възприетата схема, като е спазен добър баланс между отделните части. Трудът е написан върху 125 стандартни страници и е структуриран както следва: Справочна информация (Съдържание, Използвани съкращения) – 5 стр., Въведение – 1 стр., Литературен обзор – 33 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 11 стр., Резултати и обсъждане – 42 стр., Заключение – 3 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Списък на използваната литература включващ 192 източника, по-голямата част от които на латиница и от последните 5 години, Публикации, свързани с дисертацията – 2 стр. Представени са 34 фигури и 10 таблици, които са с необходимото качество и илюстрират подходящо дисертационния труд.

#### **Оценка на литературния обзор**

След фокусиран и отлично въвеждащ увод следва богат и компетентен литературен обзор. В него поотделно се разглежда съвременното състояние на проблемите свързани с произхода, характеристиките и приложението на хемопоеични и мезенхимни стволови клетки, методите за криоконсервация и лежащите в основата им



биофизични процеси, както и подробна характеристика и действие на ползваните в практиката криопротектори. Голяма част от обзора е посветена на сравнителен преглед на известни протоколи за изолиране, съхранение и поддържане на СК, подходите за насочено диференциране с потенциал за приложение. Обзорът е илюстриран с 9 фигури и 2 таблици, които улесняват неговото възприемане. Информацията е изложена компетентно и в достатъчен обем, като показва добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията.

### **Цел и задачи на дисертационния труд**

Целта на дисертационния труд е логично изведена от поставените проблеми в литературния обзор: 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 тази цел авторката е поставила решаването последователно на 9 задачи свързани с изолиране, характеризирани и криоконсервация на човешки хемопоеични и мезенхимни стволови клетки. Задачите са формулирани сравнително общо и уточняването на методите за „характеризиране“ и „сравнителни изследвания“ би могло да допринесе за подчертаване методичните достойнства на експерименталния труд.

### **Оценка на глава Материал и методи**

Разделът е изложен върху единадесет страници и отразява изработването на значителен по обем и богат в методично отношение експериментален материал. Методите са описани добросъвестно и подробно, което позволява тяхното възпроизвеждане и включват набор от съвременни техники. Свободното боравене с терминологията и подробното описание на методите говорят за натрупания от дисертанта богат експериментален и методичен опит. Като експериментален материал е използвана умбиликална кръв, мастна тъкан, ембриони на стадий бластоцист, както и МСК, получени от фетален черен дроб (абортен материал). Условието на получаване на пробите са утвърдени с протоколи от медицинска етична комисия и информирано съгласие. Използван е богат набор от методи за клетъчно култивиране, микродисекция и имунохирургия, пасажиране, криоконсервация чрез витрификация и програмно замразяване. Използваните химикали, хранителни среди и китове са с високо качество за работа с човешки материал. За оценка на експресията на специфични маркери за плурипотентност е използвана проточна цитометрия: (Human Mesenchymal Stem Cells Analysis Kit (BD Stemflow; отделни моноклонални антители белязани с FITC, PE, PerCP: CD10, CD11b, CD13, CD14, CD34, CD38, CD45, CD56, CD61, CD62L, CD63, CD73, CD90, CD105, HLA-DR.). Диференциацията на МСК е била изследвана чрез специални среди за диференциране: - адипогенна диференциация на МСК след достигане на 60-70% конfluентност - с Complete MesenCult Adipogenic Medium за 14 дни; - остеогенна диференциация 35 дни в Complete MesenCult Osteogenic Medium (Stem Cell Technologies); - неврогенна диференциация - с Neurogenic Differentiation Medium (PromoCell) за 1 седмица; - диференциация на ХСК 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. Анализирани са 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).

Описанието на този раздел дава кратка представа за извършената огромна по обем и трудоемкост работа, в резултат на която са получени убедителни научни резултати, представени по-нататък.

### **Оценка на получените резултати**

Резултатите от дисертационния труд са представени заедно с дискусия върху 42 страници и следват адекватно поставените задачи. По-важните от тях могат да бъдат обобщени по следния начин:

- Изолирани и култивирани са чМСК от мастна тъкан и фетален черен дроб. Проведен е морфологичен и имунофенотипен анализ на изолираните клетки. Доказани са общоприетите по стандартите на Международната асоциация по клетъчна терапия маркери за МСК като експресия на CD73, CD90, CD105 и CD44 и липса на CD45 и CD34, CD14 или CD11b, CD79 $\alpha$  или CD19 и HLA-DR; показана е диференциация *in vitro* в остеобластна и адипоцитна линия с комплексни хранителни среди. Неврогенната диференциация е анализирана посредством оцветяване на клетките с Cresyl violet и установяване наличието на нислова грануляция, което не е достатъчно за потвърждаване на този тип, но дава добра перспектива за допълнителни изследвания.

- 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.

- Съществена част от резултатите са получени вследствие на криобиологичните изследвания върху МСК което съответства на целите на дисертацията. По-конкретно е изследвана токсичността и ефекта на различни криопротектори върху чМСК: най-висок цитотоксичен ефект е наблюдаван при пробите третирани с DMSO. Според авторката: „...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.

- 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  $92.3 \pm 0.8\%$ .

- При провеждане на сравнителни изследвания на различните методи за криоконсервация върху чМСК се установява, че клетките са криотолерантни и запазват сравнително висок процент преживяеност след всички изпитани методи за



криоконсервация. Установено е, че програмното замразяване е най-ефективния метод за тяхното дългосрочно съхранение.

- При култивиране на ХСК в условия на нискодозирани физични въздействия е установено, че колонии на клетките в условия на микровибрации се образуват и нарастват по-бързо, отколкото в обикновени условия.

- 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  $83 \pm 2.1\%$ . Размразените проби след програмно замразяване са били изследвани флуцитометрично, като е отчетен висок процент жизнеспособни клетки – 91.1% (отрицателни за анексин V-FITC и пропидиев йодид) съпоставим с този при контролните проби - 94% витални клетки. Предложена е оптималната скорост на охлаждане е 1-3oC/мин.

**Към този раздел имам някои забележки и въпроси:**

1. При фиг 17 и 18 има известно разминаване с кореспондиращите в автореферата фиг. 8 и 9. Освен това не е описано, какви са клетките, условията за култивиране и третиране на негативните контроли използвани при насочената остеогенна диференциация (фиг.8, В, D) преди и след криоконсервация?

2. Същите бележки и въпроси се отнасят и за адипоцитната диференциация (19,20 съответно фиг.10 и 11 от автореферат), още повече като се има предвид склонността на МТ-МСК за спонтанна адипоцитна диференциация;

3. Предвид използването на показателя виталност за оценка на токсичност и криопротективност намирам известна противоречивост в твърдението: „...независимо от токсичното въздействие на DMSO той проявява най-добър криозащитен ефект.“ Какви са клетъчните характеристики за постигане на баланс между двата ефекта – токсичност и криозащита?

В резултат на проведените експерименти е изпълнена успешно целта на дисертационния труд. Той полага научни основи на криобиологичните изследвания върху качеството на стволови клетки за нуждите на трансплантацията и регенеративната медицина. Особено ценно е създаването и утвърждаването на протоколи за криоконсервация на характеризирани чМСК, което отваря вратата за следващи научни разработки. Дискутирането на резултатите и обособяването на раздел „Заклучение“ свидетелства за способността на докторантката да анализира критично собствените си данни, съпоставяйки ги с публикувани от други автори съобщения. Компетентната и

критична оценка е атестат за качествата и да борави със сложен експериментален материал и да проявява творчество при определяне насоките за бъдеща работа.

Въз основа на проведените експерименти са изведени 9 извода, които най-общо в описателен стил отразяват получените резултати и приемам по същество. Считаю че е могло да бъдат представени с по-голяма конкретика тъй като представят в синтезиран вид научните резултати от разработката. За оригинални приемам изводите по отношение на криоконсервацията на човешки ХСК и МСК, които отразяват комплексността на криобиологичните изследвания проведени в дисертационния труд въпреки че и тук липсва известна информативност. Останалите изводи (1,2,3,8) имат потвърдителен характер, което не намалява тяхното значение тъй като за първи път подобно обхванто изследване се представя в България. Приносителите формулирани от авторката имат научно-приложен характер, като първият е ненужно обстоятелствен. В съвкупност те дават основание дисертационният труд да бъде възприеман като значително постижение за българската трансплантационна и регенеративна медицина.

Дисертантката е набрала и надвишава значително изискуемите кредити за преминалото обучение към ЦО на БАН. Авторефератът коректно и точно представя резултатите по дисертационния труд и е оформен съгласно изискванията. По темата на дисертационния труд са публикувани в съавторство 5 научни публикации, 2 от които с импакт фактор (доклади на БАН), в едната Христова е първи автор. Представени са 6 участия в международни конференции. Извън това докторантката има активно участие в научни проекти, ръководител е на проект за млади учени към БАН, има допълнителни научни публикации и многобройни участия в научни конференции. Наукометричните показатели на този ранен етап я характеризират като успешен и перспективен млад учен.

### **Заклучение**

Рецензираният дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на съвременната биология, които са позволили реализирането на научни приноси чрез получаването на информация на най-съвременно научно ниво. Използвайки последователен и целенасочен подход изследванията са довели до получаването на оригинални научни данни с фундаментално и медико-приложно значение. Имайки предвид професионалните качества на докторантката и научните постижения в настоящия труд, изразявам своята положителна оценка за представения дисертационен труд и убедено препоръчвам на членовете на Научното жури, назначено със Заповед № 452 /14.12.2017г. на Директора на ИБИР-БАН да присъдят на Марина Деянова Христова образователната и научна степен "Доктор" в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност Физиология на животните и човека.

18.02.2017 год.

Рецензент:

проф. дбн Росица Конакчиева