

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. дбн Росица Конакчиева,

Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

върху дисертационен труд на тема: **„Изолиране и характеризиране на линии от човешки ембрионални стволови клетки“** на Борислав Емилов Арабаджиев, редовен докторант към катедра “Цитология, хистология и ембриология” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на академичната степен "Доктор" в научно направление **4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)**

Рецензирането на материалите, представени в настоящата процедура, се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилниците за неговото приложение, на Заповед № РД 38-378 /08.06.2016г. на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания, приети от Академичния съвет на СУ“ Св. Кл. Охридски“ за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности.

Борислав Емилов Арабаджиев е представил за процедурата по защитата всички необходими материали, справки и документи. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидата.

Биографични данни

Борислав Арабаджиев се дипломира в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 2004г. като бакалавър по молекулярна биология, а през 2007г. защитава с отличие дипломна работа в катедра “Цитология, хистология и ембриология“ и придобива квалификацията магистър по „Клетъчна биология и патология“. Още като студент кандидатът започва научна работа в БАН, първоначално в Института по молекулярна биология, впоследствие в Института по биофизика и биомедицинско инженерство. През 2010г. е зачислен като редовен докторант към катедра «Цитология, хистология и ембриология» в Биологическия факултет към СУ. Отчислен в редовния срок с право на защита. От 2014г. е заема позиция асистент към

катедрата и води упражнения на бакалаври и магистри, вкл. „Ембриология“, „Клетъчна пролиферация“, „Стволови клетки“, „Ядрени домени“.

Актуалност на разработвания проблем

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд попада в интензивно развиваща се и перспективна област на биомедицинските изследвания – биология на ембрионалните стволови клетки (ЕСК). 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. ЕСК са с непроучени възможности като фундаментален модел за изучаване на ранното ембрионално развитие при бозайниците и с огромен потенциал за приложение в регенеративната медицина и клетъчната терапия. Изследванията върху стволовите клетки са свързани с големи надежди за нови терапевтични подходи в здравеопазването: регенерация на тъкани и органи, перспектива за лечение, дори пълно излекуване на нелечими за момента болести, като някои заболявания на кръвта, генетични предразположения, диабет, невродегенеративни болести, увреждания на гръбначния мозък, и много други нарушения. По-специално, изследванията върху ембрионални стволови клетки могат да доведат до бързи, надеждни методи за скрининг за токсичност и ефикасност на нови лекарствени средства, без да е необходимо прилагането на тези тестове на хора. Това е свързано с драматично скъсяване на пътя за въвеждане на пазара на нови лекарства, спестяване на огромни разходи и използване на човешки ресурс.

Дисертационният труд представя научни доказателства на високо професионално ниво, че за първи път в България е внедрено know-how за изолиране и характеризиране на линии от чЕСК от „остатъчни“ ембриони, създадени по време на клинични процедури по *in vitro* оплождане на български семейства. Описани са три български човешки ембрионални линии, едната от тях с доказани свойства на плурипотентност и стабилност при култивиране. Изучени са основни фактори, участващи в насочена диференциация към невро-, мезодерма и примордиални плурипотентни клетки (ППК) и е демонстриран пролиферативен потенциал на създадената линия. Представеният труд е добра основа за разработване на ново съвременно научно направление каквото е диференцирането на ембрионални стволови клетки за създаване на моделни системи на ембрионалното развитие при човека.

Обща характеристика на дисертационния труд

Представената дисертация е организирана по възприетата схема, като е спазен добър баланс между отделните части. Трудът е написан на 113 стандартни страници и е структуриран както следва: Справочна информация (Съдържание, Използвани съкращения) – 5 стр., Въведение – 1 стр., Литературен обзор – 27 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 11 стр., Резултати и обсъждане – 46 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Списък на използваната литература – 16 стр., Публикации, свързани с дисертацията – 3 стр.

Дисертационния труд е онагледен с 11 схеми, 1 таблица и 45 фигури. Трябва да се отбележи високото качество на включените микроснимки от светлинна и имунофлуоресцентна микроскопия, които са не само убедителен илюстративен материал, но и затвърждават общото впечатление за прецизно извършена изследователска работа. Литературната справка включва 229 източника, като преобладават автори след 2000 година, публикувани в реномирани медицински и биологични издания. ,

Към дисертацията е приложен автореферат и диск, съдържащ видеофилми. Авторефератът е изготвен старателно на 50 страници и отговаря на изискванията, като съдържа въведение в проблема, цели и задачи, материал и методи, резюмирано описание на получените резултати и илюстрация на най-важните от тях, дискусия, изводи и приноси.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор обхваща няколко раздела, последвателно въвеждащи в произхода и биологията на стволите клетки, молекулните механизми, отговорни за поддържане на плурипотентното състояние и съответно маркерите, дефиниращи на този етап ЕСК. Голяма част от обзора е посветена на сравнителен преглед на известните протоколи за изолиране, съхранение и поддържане на ЕСК, подходите за насочено диференциране с потенциал за приложение. Обзорът е илюстриран с 11 схеми, които улесняват неговото възприемане. Информацията е изложена компетентно и в достатъчен обем, като показва добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията. Последната глава в която се дискутира въпросът за необходимостта от създаването на нови линии ЕСК, служи за естествен преход и мотивира последващата експериментална част.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на дисертационния труд е ясно и конкретно формулирана: „Да се създадат български линии от човешки ембрионални стволови клетки и да се проучат

възможностите за тяхната диференциация“. За постигане на целта са изведени седем задачи, които са логично обосновани и очертават последователен научно-експериментален подход , а именно:

1. Да се изолират клетките от вътрешната клетъчна маса на човешки ембриони като се апробират методите на имунохирургия и механично изолиране.

2. Да се установят линии от човешки ембрионални стволови клетки, като се приложат методите на механично и ензимно пасажиране и отглеждане върху подхранващ слой от фибробласти.

3. Да се подбере подходящ протокол за криопрезервация на изолираните линии от човешки ембрионални стволови клетки.

4. Да се характеризира плурипотентността на клетките от изолираните линии от човешки ЕС клетки чрез изследване експресията на основни марки за плурипотентност.

5. Да се проучи възможността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до производни на ектодермата.

6. Да се установи способността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до производни на мезодермата.

7. Да се изследва възможността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до герминативни клетки.

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. За целите на дисертацията са дарени чрез информирано съгласие двадесет и четири ембриона от различни стадии на развитие получени ин-витро в клиника по асиситирана репродукция. От тях успешно са изолирани три линии човешки ембрионални стволови клетки. Те са обект на по-нататъшните изследвания по характеризиране и диференциране.

Използван е богат набор от методи за клетъчно култивиране, микродисекция и имунохирургия, ензимно и механично пасажиране, криоконсервация чрез ин-витро

витрификация. За оценка на експресията на специфични маркери за плурипотентност са използвани имунофлуоресценция: Oct-4, SSEA4 и Tra-1-60 (в линиите VABE1 и VAM1), количествен ДНК анализ (RT-PCR): Nanog, Oct-4 и Sox2 (в линиите VABE1 и VABE2), хистохимия на алкална фосфатаза в линиите VABE1 и VAM1. За изследване кариотипа и пола на получените линии от ЧЕСК е използван цитогенетичен анализ, а експресията на маркерите на тъканна съвместимост (HLA-ABC, HLA-DR и HLA-G) са изследвани чрез поточна цитометрия. Описанието на този раздел дава кратка представа за извършената огромна по обем и трудоемкост работа, в резултат на която са получени прецизни и убедителни научни резултати, представени по-нататък.

Оценка на получените резултати

Резултатите от дисертационния труд са представени заедно с дискусия върху 46 страници и следват адекватно поставените задачи. По-важните от тях могат да бъдат обобщени по следния начин:

- Получени са три линии от човешки ембрионални стволови клетки – VAM1, VABE1 и VABE2.
- Убедително е показан плурипотентния характер на изолираните линии, като най-стабилната линия VABE1 е охарактеризирана най-пълно и е подбрана за последващите експерименти по спонтанна и насочена диференциация.
- Демонстрирана е способността на линията VABE1 да се диференцира до клетъчни типове представляващи невроектодерма, мезодерма и примордиална герминативна линия
- Извършена е успешна модификация на метод за получаване на кардиомиоцити чрез използване на НТВ-9 кондиционирана среда
- Приложен е оригинален метод за диференциация до примордиални герминативни клетки със запазена пролиферативна активност.

Накратко основните постижения на дисертационния труд могат да бъдат резюмирани по следния начин: Въведен е класически метод за създаване на линии от ЧЕСК (този метод все още не е прилаган в България) от „излишни“ (т.нар. сираци) ембриони, създадени по време на клинични процедури по *in vitro* оплождане на безплодни български семейства. Чрез този метод са получени три български линии от ЧЕСК – една, произхождаща от ембрион на стадий морула и две линии от ембриони на стадий бластоцист. И трите линии експресират характерните за ЧЕСК плурипотентни маркери Oct-4, TRA 1-60, SSEA-4 и алкална фосфатаза, проявяват способност за спонтанна диференциация и могат да формират ембрионни телца, съдържащи представители и на трите зародишни листа. Проучени са някои фактори, насочващи

диференциацията на чЕСК към формиране на женски полови клетки. Проверката на различни техники на обработка и комбинации от различни фактори показват, че третирането на чЕСК с BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF стимулира формирането Vlimp1-позитивни примордиални полови клетки, както и развитието им до Vasa-позитивни гоноцити. По-специално е демонстрирана способността на линията BABE1 да се диференцира до клетки характерни за невроектодерма, мезодерма и до примордиални герминативни клетки, функционално доказателството за стволовоклетъчния характер на установената линия. Представен е модифициран метод за получаване на кардиомиоцити чрез използване на НТВ-9 кондиционирана среда.

В резултат на проведените експерименти е изпълнена успешно целта на дисертационния труд. Тази работа поставя на научни основи изследванията върху човешките ембрионални стволови клетки (чЕСК) в България и може да бъде стандарт за последващи изследвания по яснотата и методичната прецизност на извършената работа. Особено ценно е създаването и утвърждаването за експериментално верифициране на протоколи по изполиране, поддържане и характеризирание на чЕСК, което отваря вратата за следващи научни разработки. В случая много важно е и обстоятелството, че дисертантът е младши преподавател, който може да постави основите на нова школа от бъдещи изследователи.

Дискутирането на резултатите свидетелства за способността на дисертанта да анализира критично собствените си данни, съпоставяйки ги с публикувани от други автори съобщения. Компетентната и критична оценка е атестат за качествата на кандидата да борава със сложен експериментален материал и да проявява творчество при определяне насоките за бъдеща работа.

Въз основа на проведените експерименти са изведени пет извода с оригинален характер, които коректно отразяват получените резултати и приемам по същество.

По темата на дисертационния труд са публикувани пет статии, три от които в списания с импакт фактор, в четири кандидатът е първи автор. Материали по дисертационния труд са докладвани от Б. Арабаджиев на три научни форума. Справката за цитиранията на публикуваните трудове представя 16 забелязани цитирания без автоцитирания.

Борислав Арабаджиев е активен млад учен - участник в няколко проекта: два научно-изследователски финансирани от Фонд Научни Изследвания в периода 2008 – 2011; и участник в целева група по два проекта финансирани по ОП Човешки ресурси за обучение в интердисциплинарни биологични направления.

Заклучение

Рецензираният дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на клетъчната и молекулярната 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 дисертантката и научните постижения в настоящия труд, изразявам своята положителна оценка за представения дисертационен труд и убедено препоръчвам на членовете на Научно жури, назначено със заповед № РД 38-378 /08.06.2016г. год. на Ректора на СУ да присъдят на Борислав Емилов Арабаджиев образователната и научна степен "Доктор" в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност Клетъчна биология (ш. 01.06.18).

30.06.2016 год.

Рецензент:

проф. дбн Росица Конакчиева