

## РЕЦЕНЗИЯ

**Върху:** дисертационен труд за присъждане на научната и образователна степен „доктор“, по Професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.18. Клетъчна биология

**Автор на дисертационния труд:** Борислав Емилов Арабаджиев, редовен докторант към катедра “Цитология, хистология и ембриология“ при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

**Тема на дисертационния труд:** „Изолиране и характеризиране на линии от човешки ембрионални стволови клетки“

**Рецензент:** доцент д-р Пламен Тодоров Тодоров, Институт по биология и имунология на размножаването – БАН, определен за член на научното жури със Заповед 038-378 /08.06.2016г. от Ректора на СУ

### 1. Информация за кандидата:

Дисертантът Борислав Арабаджиев е роден на 21.08.1980г. Завършва висшето си образование в СУ «Св. Климент Охридски», Биологически факултет, през 2004г. (бакалавър по молекулярна биология). През 2007г. придобива квалификацията магистър по специалност „Клетъчна биология и патология“. Започва научната си дейност в Института по молекулярна биология към БАН. В периода 2007-2008г. заема длъжност „биолог“ в Института по биофизика, БАН. През 2010г. е зачислен като редовен докторант към катедра «Цитология, хистология и ембриология» в Биологическия факултет към СУ. Отчислен е с право на защита. Освен с научна, дисертантът се занимава и с преподавателска дейност. От 2014г. е асистент към катедрата.

### 2. Актуалност на проблема:

Представеният ми за рецензия труд касае важни за медикобиологичната наука проблеми – задълбочаване на изследванията върху човешки ембрионални стволови клетки, оптимизиране на методите за култивиране, съхранение и използване на този вид биообекти. Независимо от огромните надежди и многобройните проучвания в тази област, ембрионалните стволови клетки все още не са намерили своето приложение в медицината. В голяма степен това се дължи на технически трудности при получаване на материала, отсъствие на добра колаборация между центровете за репродуктивна медицина и изследователските екипи, законови и етични ограничения и др. Освен чисто генетическите вариации, вече изолираните линии демонстрират и разлики в потенциала си за диференциация, дължащи се вероятно на различните техники за изолиране и култивиране на колониите. Това налага не само оптимизиране на съществуващите и разработка на нови протоколи за работа с човешки ембрионални стволови клетки, които да обезпечат условия за максимално съхранение на тяхната плурипотентност, но и създаването и характеризирането на нови линии. Поради това считам, че представеният дисертационен

труд е актуален. Още повече, че за България направлението е абсолютно ново. Не ми е известно в нашата страна досега да са провеждани такъв род изследвания. Считам, че избраната тема на дисертацията е значима както от фундаментална гледна точка, така и от приложно-практическа и подобни разработки допринасят за издигане авторитета на българската наука.

### **3. Описание на дисертацията:**

Дисертацията е представена на 113 стандартни страници. Трудът 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 съдържа 11 схеми, 1 таблица и 45 фигури. Цитирани са 229 литературни източника. Към дисертацията е приложен автореферат (50 стр.) и диск, съдържащ видеофилми.

### **4. Степен на познаване състоянието на проблема**

Литературният обзор е подробен, обхваща достатъчен брой източници и отразява дискуссионния характер на избраната тема. Той се базира на 229 заглавия, повечето от които са публикувани през последните десет години. Състои се от няколко части, в които авторът разглежда ранното ембрионално развитие, видовете стволови клетки и техните характеристики, като по-конкретно и задълбочено анализира методите за получаване, култивиране, характеризирание, криоконсервация и диференциация на човешките ембрионални стволови клетки. Представената информация е онагледена с 11 схеми, които улесняват нейното възприемане.

Нямам забележки към обзора, считам, че дисертантът демонстрира отлична информираност и познаване на материята, както и че умее да анализира и интерпретира литературните данни.

### **5. Цел, задачи, материал и методи на изследване**

Мотивировката на настоящето проучване логично произтича от направения литературен анализ. Целта на дисертационния труд – „Да се създадат български линии от човешки ембрионални стволови клетки и да се проучат възможностите за тяхната диференциация“ е ясно и точно формулирана. Така поставената цел предполага решението на 7 задачи, които са насочени към изолиране, характеризирание и опити за диференциация на нови, оригинални линии ембрионални стволови клетки. Те са логично обосновани, произтичат от поставената цел и са реално изпълними.

Като изследователски материал дисертантът използва 24 ин-витро получени ембриона на различни стадии на развитие, от които успешно изолира три линии човешки ембрионални стволови клетки. Те са обект на по-нататъшните задълбочени изследвания.

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, молекулярно-биологични техники 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.

## **6. Резултати и обсъждане**

Разделът „Резултати и обсъждане” включва голям обем собствени данни на автора, представени систематично и прегледно в 9 части и 12 подчасти, в последователност следваща поставените за решаване в дисертацията задачи. Резултатите са онагледени с 45 фигури, като много добро впечатление прави високото качество на снимковия материал. Повечето от фигурите представляват табла с поредица от монтирани фотографии, така че действителният брой на представената документация е значително по-голям.

От използваните общо 24 ембриона, авторът успешно изолира три линии човешки ембрионални стволови клетки – VAM1, VABE1 и VABE2. С помоща на прецизни, взаимно-допълващи се микроскопски и молекулярно-биологични техники е показано, че и трите имат характерна за стволовите клетки морфология и експресират специфични маркери за плюрипотентност. За всички резултати е представен съответния доказателствен материал – имунофлуоресцентни образи, получени след обработка с антитела срещу Oct-4, SSEA-4, TRA-1; оцветяване с Hoechst, снимки от фазовоконтрастна и светлинна микроскопия, показващи активността на алкалната фосфатаза, гелове, кариограми, хистограми и др.

С цел намножаване и стокиране на клетките за бъдещи експерименти дисертантът разработва оригинална техника за свръхбързо замразяване на колонии. Предложението от него метод за *in situ* витрификация на адхезирали върху Laminin-521 човешки ембрионални стволови клетки в стандартни 4 ямкови плаки осигурява много добра преживяемост и възстановяване на клетките след размразяване без спонтанна диференциация.

Като най-стабилна в условията на дълготрайно култивиране и криоконсервация (най-ниска склонност към спонтанна диференциация) се проявява линията VABE1, поради което авторът я използва в последващите експерименти. Установено е, че тя експресира всички основни маркери за плюрипотентност, има нормален XY кариотип, може да формира ембрионни тела и да се диференцира към екто-, ендо- и мезодерма, което я определя като пълноценна линия от човешки ембрионални стволови клетки. Чрез флоцитометричен анализ е установено, че клетките имат слаба експресия на HLA клас 1, което ги прави подходящ обект за евентуално практическо използване.

На базата на добре планирани и акуратно изпълнени експерименти докторантът показва, че изолираните от него човешки ембрионални стволови клетки при култивиране в

суспензия формират ембрионидни тела, при които впоследствие се наблюдава спонтанна диференциация към ектодерма, мезодерма и ендодерма.

Особен интерес представлява частта от дисертационния труд, в която са представени резултатите от опитите за насочена диференциация на ембрионалните клетки. Показано е, че в клетъчната линия VABE1 при осигуряването на определени условия (модифицирана от дисертанта методика) може да бъде индуцирана към невроектодерма и неврони. Клетките могат също така да се диференцират към кардиомиоцити след третиране на получените ембрионидни тела с кондиционирана среда от клетъчната линия НТВ-9.

Клетки от VABE1 успешно са диференцирани към примордиални герминативни клетки чрез третиране с коктейл от факторите BMP4, BMP7, BMP8b, GDNF и SCF. На базата на получените резултати авторът предлага протокол за индуциране към VASA позитивни герминативни клетки, при това със запазена пролиферативна активност, включващ третиране с BMP4 и използване на кондиционирана среда.

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.

## **7. Изводи и приноси**

Правилно изведени и точно формулирани са 5 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 в България е приложена успешно технологията за получаване на линии от човешки ембрионални стволови клетки;
- Създадена е първата характеризирана българска линия от човешки ембрионални стволови клетки;
- Разработен е оригинален метод за насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки към късни премейотични VASA позитивни примордиални герминативни клетки, основан на първоначална индукция с BMP4 и последващо отглеждане в среда, кондиционирана от човешки амниотични стволови клетки.

Отделно от това в дисертацията намирам и редица потвърдителни приноси, както и такива с научно-приложен характер, какъвто е например оптимизирането на техниката за витрификация на човешки ембрионални стволови клетки.

## **8. Критични бележки**

Имам следните забележки към дисертационния труд:

Не съм съгласен с твърдението на автора (стр. 48), че „няма корелация между качеството на ембрионите и успеваемостта при изолирането на линии ЧЕСК от тях“. В

подкрепа на тази своя теза авторът цитира литературни данни за получени линии от ембриони с ниско качество, но това едва ли е основание за подобно заключение. Това, че има изолирани линии и от некачествени ембриони, не значи, че няма корелация между качеството на ембрионите и изолираните линии.

Навсякъде в дисертацията под термина „бавно замразяване“ авторът описва и подразбира стъпковото понижаване на температурата (прехвърляне на пробите на пониски температури), което води до приблизителна средна скорост на охлаждане около 1<sup>0</sup>С/мин. Известно е, че за високочувствителни обекти (каквито са предимплантационните ембриони, ембрионалните стволни клетки и др.) при бавно замразяване се препоръчва използването на програмен замразител, позволяващ контролирано понижаване на температурата в различните интервали и индуцирането на сидинг. Едва ли е коректно да се говори, че тази технология за криоконсервация е нискоефективна, при условие, че дисертантът не е използвал програмно замразяване.

Дискутирайки техниката за витрификация и получените резултати (стр. 55), дисертантът отбелязва, че е „използвал минимално количество среда за замразяване, тъй като това дава по-голямо отношение повърхност/обем“. Не съм съгласен с това, тъй като в криобиологията под термина „повърхностно/обемно съотношение“ се разбира съотношението на общата площ на цитоплазмената мембрана към обема на клетката, което е специфично за всеки вид клетки и количеството на витрификационния разтвор не влияе върху него.

Имам и една чисто техническа забележка - на някои от фигурите не е уточнено микроскопското увеличение, при което са правени снимките;

Направените от мен бележки в никакъв случай не омаловажават достойнствата на дисертационния труд и са по-скоро препоръки към бъдещата научна дейност на автора.

## **9. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 5 публикации и са докладвани на 3 конференции. Личният принос на дисертанта е несъмнен – той е първи автор в четири от статиите и във всички участия на научни форуми. И петте са на английски език в реферирани международни издания, три от тях са в списания с импакт фактор. Цитирани са 16 пъти, което е показател за тяхното качество. Това ми дава основание да оценя високо публикационната активност на дисертанта.

Представеният автореферат е изготвен в съответствие с изискванията и отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

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 Софийския университет, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Борислав Арабаджиев образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност „Клетъчна биология“.

Дата: 24.06.2016г.

Рецензент:

/доц. Пламен Тодоров, дб/