

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „ДОКТОР“, професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност 01.06.08 „Биофизика“ на тема:

„РОЛЯ НА ЕЛАСТИЧНОСТТА НА СУБСТРАТА В ОСТЕОГЕННАТА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ“,

разработен от **Милена Любомирова Керемидарска**, редовен докторант в секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“ на Института по биофизика и биомедицинско инженерство при Българската академия на науките с научен ръководител доц. д-р Наталия Кръстева.

Рецензент: Доц. д-р Виктория Виткова Виткова, Институт по физика на твърдото тяло, Българска академия на науките

Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на дисертанта

Милена Керемидарска е получила своята бакалавърска степен по молекулярна биология в Софийския университет „Св. Климент Охридски“ през 2011 г., а две години по-късно е завършила успешно магистърската програма по клетъчна биология и патология към същия университет. През 2013 година, веднага след магистратурата си, дисертантката е започнала работа като биолог в Института по биофизика и биомедицинско инженерство при БАН, където се е занимавала с отглеждане на клетъчни култури и провеждане на експерименти с тях. През същата година в резултат на своите мотивация и интерес към научноизследователската дейност и след спечелване на конкурс за редовна докторантура, М. Керемидарска е зачислена като редовен докторант към Секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“ към ИБФБМИ-БАН под ръководството на доц. Наталия Кръстева. Прави силно впечатление фактът, че дисертантката започва публикационната си дейност още по време на магистратурата си, като до момента М. Керемидарска е част от авторските колективи на осем публикации в реферирани научни издания.

Актуалност на разработвания в дисертацията проблем

Темата на дисертационния труд е тясно свързана с ролята на мезенхимните стволови клетки (МСК) в костно-тъканното инженерство. Един от подходите за лечение на костни заболявания в съвременната медицина е базиран на използването на различни видове костни импланти. Изискванията към свойствата на материалите, използвани за създаването на такива импланти, включват модул на еластичност, подобен на този на костта (~10 GPa), якост и други характеристики, благоприятстващи пролиферацията и остеобластната диференциация на стволовите клетки. Процесът на развитие и усъвършенстване на имплантите е резултат от съвместните усилия на специалисти в различни области и мотивира осъществяването на изследвания за биологичното охарактеризиране на материали с подобрени свойства за приложение в имплантологията. Във фокуса на изследванията, включени в дисертационния труд, е поведението на МСК в хода на остеогенезата върху слоеве на основата на силикони и диамантени наночастици с различна еластичност, създадени чрез прилагането на различни методи. Концепцията на включените в дисертацията изследвания е разработена в унисон със съвременните стратегии на костно-тъканното инженерство и регенеративната медицина. Изследвано е взаимодействието на нови биоматериали с МСК от мастна тъкан. За разлика от традиционно използваните в тъканното инженерство стволови клетки от костен мозък, МСК от мастна тъкан имат предимството да се изолират по-лесно и в по-голямо количество, но не притежават високия остеохондрален диференциационен капацитет на МСК от костен мозък. В тази връзка е от особено значение да бъде изследван остеогенният потенциал на МСК от адипозна тъкан и възможностите за неговото индуциране при прилагането на нови композитни материали. Понастоящем с развитието на тъканното инженерство в понятието биосъвместимост на материалите се включва не само изискването за липса на токсичност и нежелани странични ефекти на материалите в контакт с жива тъкан, но също така и наличие на свойства, способстващи интеграцията на материала с естествената тъкан, както и осигуряването на необходимите условия за пускане в ход на собствените възстановителни

механизми на биологичната система с цел, пълното тъканно възстановяване. Именно този подход е заложен при разработването на научноизследователския проблем в рамките на дисертационния труд.

Общ преглед на дисертационния труд

Дисертационният труд се състои от 125 страници, съдържащи текст, 43 фигури и една таблица. Структурата и оформлението му отговарят на установените стандарти. Налични са изискваните заглавна страница, съдържание, списък на използваните съкращения, увод, литературен обзор, формулировка на целите и задачите, описание на материалите и методите, използвани в изследването, представяне на получените в дисертацията резултати и тяхната дискусия, заключение, изводи и обобщение на приносите на дисертанта. В дисертационния труд е включен списък с участията в научни конференции, както и списък на научните публикации на кандидата, свързани с дисертацията, забелязаните цитати и цитираната литература. Библиографията обхваща 127 литературни източника, представящи фундаменталните и съвременните постижения в изследваната област. Почти всички цитирани източници са публикувани през последните 20 години, тъй като разработваният в дисертацията проблем попада в сравнително нова и динамично развиваща се интердисциплинарна област.

Изложението свидетелства за запознатостта на дисертантката със световната библиография в областта. В направения литературен обзор в обем от 43 страници се обосновава актуалността на тематиката. На базата на задълбочена оценка на литературния материал е формулирана **целта на дисертацията**, както следва: ***Изследване на влиянието на еластичността на нови композитни материали, близка до тази на нативната костна тъкан, върху адхезивното поведение, растежа и остеогенната диференциация на мезенхимни стволови клетки с оглед създаването на подходящи субстрати за насочена диференциация на стволовите клетки.***

Обект на изследване в дисертационния труд са биоматериали с потенциал за приложение в костно-тъканното инженерство и регенеративната медицина, като акцентът е поставен върху тяхното биологично характеризирание чрез изследване на адхезивното поведение, на два различни типа мезенхимни стволови клетки. Клиничното им приложение обаче е лимитирано от невъзможността за предсказуемо контролиране на тяхната диференциация. Ето защо за оптималното използване на МСК е необходимо добро познаване на факторите, които управляват тяхното първоначално разпределение в организма, тъканно-специфичната им активация и последващата им диференциация до остеообласти. В светлината на установената в литературата роля на еластичността на субстрата при остеогенната диференциация на МСК е от особено значение провеждането на систематични изследвания в тази насока.

За постигането на формулираната цел кандидатът си поставя за изпълнение три групи задачи, както следва:

- I. Изработване на материали с различна еластичност по два различни метода:
 1. Конвенционална полимеризация, чрез вариране концентрацията на омрежващия агент в органосиликона
 2. Плазмена полимеризация чрез вариране концентрацията на нанодиамаментни частици в органосилкона
- II. Физико-химично охарактеризиране на получените материали:
 1. Определяне на размерите и химичния състав на нанодиамаментните частици
 2. Измерване на повърхностната хидрофилност/хидрофобност на получените материали
 3. Определяне на повърхностната микро- и нанотопография
 4. Измерване на модула на еластичност на материалите
- III. Биологично характеризирание:
 1. Оценка на цитотоксичността на нанодиамаментните частици
 2. Изследване на началната адхезия на МСК върху материалите с различна еластичност
 3. Изследване на пролиферацията на МСК върху материалите с различна еластичност
 4. Изследване на остеогенната диференциация на МСК при култивиране върху материалите с различна еластичност в присъствие и отсъствие на остеогенни фактори

Избраните научноизследователски методи са на високо съвременно ниво, съответстват на целта на дисертационния труд и позволяват успешното разрешаване на поставените задачи. Подбрани и приложени са взаимодопълващи се и добре развити експериментални методи, сред които имунофлуоресцентни методи, атомносилова микроскопия, методи за изолиране на мезенхимни стволови клетки от костен мозък на плъх и клетъчно култивиране, функционализиране на композитни субстрати с флуоресцентно маркиран фибронектин, колориметрични методи за изследване на клетъчния растеж и остеогенната диференциация. В главата „Материали и методи“ подробно е описана използваната апаратура, както и биологичните методи, приложени за изпълнението на формулираните цел и задачи на дисертацията.

МСК се специализират в определения клетъчен тип чрез двустъпален процес, включващ фазите детерминация и диференциация. Клетките силно се влияят от биологичните, биохимични и биофизични стимули от обкръжаващата ги среда. Под комплексното влияние на тези фактори МСК преминават през процеса на остеогенна диференциация, като конкретният механизъм все още не е изяснен докрай и представлява обект на усилено изучаване.

Поради рисковете, свързани с опасността от повлияването на функциите и на нетаргетни клетки и пораждането на опасност от развитие на тумори и други нежелани ефекти стремежът е избягване на *in vivo* приложението на разтворимите фактори в насочването на диференциацията на МСК. Тук е важно да се отбележи, че усилията в дисертационния труд са насочени именно към намирането на подходящ биоматериал, който специфично да направлява диференциацията на МСК дори в отсъствието на растежни фактори.

В дисертацията са изследвани и процесите на калциево отлагане върху различни композитни материали, което представлява важен етап от остеогенезата. Изследването на този процес е свързан с ролята на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) като резервоар за растежни фактори, цитокини и ензими и значението на неговите структурни, биохимични и механични свойства при важни клетъчни процеси като пролиферация, миграция и диференциация на МСК.

В дисертационния труд са разгледани установените в литературата фактори за адхезията, пролиферацията и диференциацията на МСК, а именно химичният състав, физичните характеристики на ЕЦМ, в това число грапавост, размер на порите, хидрофилност, еластичност и др. Особено значение за остеогенната диференциация на МСК имат повърхностните свойства на субстрата, като върху по-грапави повърхности се наблюдава засилена остеогенна диференциация на мезенхимните стволови клетки в сравнение с гладки повърхности. Остеогенната диференциация на МСК, индуцирана от нанотопографията, не е зависима от наличието на разтворими фактори. Особено важен фактор за формирането на костна тъкан се оказва и порьозността на биоматериалите, както и размерът на порите и връзката между тях.

Предмет на изследване в дисертационния труд е ролята на еластичността на субстрата при диференциацията на стволовите клетки, фактор, за който съществуват доказателства в литературата, че е дори по-селективен от разтворимите фактори за остеогенезата. В уводната част на ръкописа докторантката въвежда понятието модул на еластичност на субстрата. Предвид обстоятелството, че по-нататък в текста многократно се споменава и механичната характеристика твърдост, изложението би спечелило, ако тази механична характеристика бъде дефинирана и се коментира връзката ѝ с модула на еластичност на изследваните биоматериали. Същото се отнася и за количественото определяне на грапавостта на изследваните материали при изпълнението на първата група задачи от дисертацията. Във връзка с това, че при изследването на топографията на DND (детонационни нанодиаменти)-съдържащите композити е направен сравнителен анализ на този параметър за субстратите, получени при използването двата подхода на плазмена полимеризация, е необходимо величината R_a (стр. 69) да бъде предварително въведена. В интерес на пълнотата на изложението би било добре в частта „Материали и методи“ да присъства малко по-подробно описание на методите за количественото измерване на физикохимичните характеристики на изследваните биоматериали.

Наред със строго специфичните изисквания към биоматериалите в съответствие с конкретното им приложение в регенеративната медицина, могат да бъдат формулирани някои общи основни характеристики на биоматериалите за успешното им приложение в тъканното инженерство, а именно биосъвместимост, биоразградимост, механична здравина и порьозност. В изложението си дисертантката коментира подробно значението на всяко едно от тези изисквания, като се спира по-подробно на влиянието на физикохимичните и механични характеристики на биоматериалите върху тяхното взаимодействие с МСК с цел, успешното моделиране на стволова ниша за остеогенезата.

По отношение на ролята на еластичността на субстрата в дисертацията е обсъдено и значението на механотрансдукцията в процеса на остеогенезата. Особено внимание се обръща на повърхностните свойства на биоматериалите с потенциално приложение в регенеративната медицина. Поведението на биомедицинските импланти може да бъде променено чрез модифициране на техните повърхностни свойства. Изследван е потенциалът на биоматериалите за функционализиране с протеини, характерни за ЕЦМ и необходими в процеса на клетъчна адхезия и късна диференциация при остеогенезата.

Акцентът на дисертационния труд е върху групата на органосиланите като субстрат за изследване на адхезията и диференциацията на МСК. В литературата съществуват данни за потенциала на приложение на детонационните нанодиаменти (DND) в костно-тъканното инженерство поради комбинирането на изключителната твърдост и химичната стабилност на диамантите с предимствата на наноматериалите като подходящ (нано-) размер, голяма повърхност и висок адсорбционен капацитет. Важно предимство на DND е и ниската им токсичност в сравнение с други въглеродни материали.

В рамките на дисертацията с цел, биологичното им характеризирание, са изследвани композитни материали, съдържащи различни видове наночастици. Като първа стъпка в това изследване е предприето характеризирането на самите нанодиаментни частици, за да бъдат определени техните размери, качественият и количественият състав на химичните примеси в тях както и тяхната цитотоксичност. Следващият етап от разработката се състои в количествената оценка на топографията и биосъвместимостта на DND-съдържащи силоксанни композити, плазмено полимеризирани чрез два различни подхода. За определяне на цитотоксичността на DND частиците са изследвани растежът и еволюцията в морфологията на МСК, изолирани от костен мозък на плъх. Прави впечатление методичността при подбора на вида клетки, продиктуван от по-високата чувствителност към екзогенни фактори на първичните клетки в сравнение с клетъчните линии. Видът на използваните в композитите DND частици и подходът при плазмената полимеризация на силоксановите материали, са подбрани на базата на получените резултати за най-ниска токсичност и биосъвместимост. Количественият анализ на прикрепянето на клетките върху композитните силоксанови субстрати дава информация за началната клетъчна адхезия, която е важна стъпка в биологичното характеризиране на изследваните материали. Същата е изследвана и след преадсорбция на фибронектин (един от основните ЕЦМ-протеини) върху полимерните подложки. Определям като важен резултата от сравнителния анализ на данните за началната клетъчна адхезия на МСК върху „голи“ и покрити с фибронектин подложки, който показва, че функционализирането на изследваните повърхности с протеина не води до статистически значима промяна на клетъчното прикрепяване при три от изследваните повърхности. Увеличение на броя прикрепени МСК се отчита единствено при подложката 1-DND/PPHMDS, съдържаща DND-частици и подготвена при предварително смесване на мономерите със суспензия от нанодиаментни частици с последваща плазмена полимеризация. Подобрена адхезия на клетките е установена и в случая на 1-DND/PPHMDS, което заедно с установеното нарастване на броя адхезирали клетки, свидетелства за положителния ефект от адсорбирането на фибронектин върху взаимодействието на клетъчния материал със субстрата. Допълнителна информация в тази посока е получена чрез проследяването на динамиката на организацията на актиновия цитоскелет на клетки, адхезирали върху изследваните полимерни подложки. В изпълнение на задачата за биологичното характеризиране на композитните материали е изследван и клетъчният растеж на МСК. Установява нарастване на броя на клетките при всички изследвани видове субстрати за целия проследен период от седем дни, като най-високо нивото на клетъчния растеж остава върху стъклената подложка (контролата). Резултатите показват също така слабо потискане на клетъчния растеж при легиране на силоксановите материали с DND.

Особено важен етап от биологичното характеризиране на композитите е изследването на остеогенната диференциация на МСК в отсъствие на разтворими стимули. За целта е изследвана алкално-фосфатазната активност на МСК от костен мозък на плъх за седемдневен период от време при инкубацията им върху различните видове композитни материали. Получените резултати свидетелстват за най-висока активност на ензима при инкубация върху 2-DND/PPHMDS, като алкално-фосфатазната активност при 1-DND/PPHMDS е почти три пъти по-ниска.

За изясняване на ефектите на еластичността на субстрата са изследвани клетъчната адхезия, растеж и потенциалът за индуциране на остеогенна диференциация на еластомери от полидиметилсилоксан (PDMS) с различни механични свойства. Модулирането на твърдостта на PDMS-подложките е постигнато чрез използването на три комбинации от силанов прекурсор и ретикулант, при свързването на които се получава интертен материал с различни механични

свойства. В дисертацията не се намира информация за проведени изследвания с цел, установяване на инертността на получените еластомери след химическата полимеризация на двукомпонентния органосилан. Такива данни биха внесли яснота относно влиянието на евентуални химически фактори върху адхезивното поведение на клетките.

В дисертацията е измерен ефективният модул на еластичност на повърхността на еластомерите с различна твърдост, при което очаквано е установен най-висок модул на еластичност при най-твърдия материал (Sh70). Установява се намаляване на клетъчния растеж на МСК при увеличаване на твърдостта на субстрата. Получено е, че секрецията и организацията на фибронектиновия матрикс е най-голяма върху еластомера с най-слаба хидрофобност.

При плазмено полимеризираните органосилани е наблюдавана монотонна пропорционална зависимост между преадсорбцията на фибронектин и концентрацията на DND-частици в подложката, като средната площ на разстилане на човешки МСК е най-голяма при максималната изследвана концентрация на DND-частици и в двата случая на непокрити и покрити с фибронектин подложки. В дисертацията са получени доказателства за способността на композитните материали да стимулират клетъчната пролиферация, като е докладвана по-голяма митохондриална активност на МСК в сравнение с контролата.

Като заслужаващи особено внимание определям резултатите от изследванията с композитни субстрати, съдържащи диамантени наночастици, и характеризиращи се с твърдост, близка до тази на нативната костна тъкан. По отношение на тяхната остеогенност най-високите нива на калциево отлагане са отчетени за материала с най-висок модул на еластичност (най-висока концентрация на DND-частици). В допълнение към добрата адхезия на МСК, наблюдавана върху същия композит, се оформя заключението, че получените от субстрата механични стимули заедно с разтворимите остеогенни фактори произвеждат синергичен ефект върху остеогенната диференциация на клетките.

Въз основа на изложението на дисертационния труд имам основание да заключа, че оригиналният материал, включен в дисертацията, е получен напълно коректно. Фигурите, представящи флуоресцентните и фазовоконтрастните микрограми на изследваните клетки, достатъчно нагледно илюстрират докладваните резултати и подкрепят направените изводи и заключения. Графичните и табличните представяния на получените данни са достатъчно информативни и отразяват количествените резултати от проведените експериментални измервания заедно с техните доверителни интервали. Горепосоченото ми позволява да оценя материала като достоверен и оригинален. Имам основание да обобща, че са спазени методичните изисквания при извършването на всички етапи от експерименталните изследвания, чието успешно изпълнение свидетелства за отличната мултидисциплинарна подготовка на дисертантката.

Приноси на дисертационния труд

В заключение на дисертационния труд са направени пет извода и са формулирани четири основни приноса. Приносите на дисертанта имат оригинален характер с научно значение. Относно формулировката на първия принос, отнасящ се до създаването на материалите, използвани в дисертационния труд, по-рано в текста на дисертацията е посочено, че те са създадени и разработени в Химикотехнологичния и металургичен университет в София и Института по физика на твърдото тяло – БАН.

За първи път е получена информация за влиянието на метода на включване на диамантени наночастици в силиконов полимер при плазмена полимеризация върху повърхностните свойства на композитите и поведението на мезенхимно стволони клетки. В рамките на дисертационния труд е разработена чиста моделна система за изследване ефекта на еластичността на субстрата върху остеогенната диференциация на МСК. Оригинален принос на кандидата е и осигуряването на експериментални доказателства за ефекта на модула на еластичност на силоксанови композити с DND частици със стойности от 0.5 до 3.8 GPa, близки до тези на нативната костна тъкан, върху остеогенната диференциация на човешки МСК от мастна тъкан. За първи път са изследвани поведението и остеогенната диференциация на МСК от мастна тъкан върху композитни слоеве с различна концентрация на диамантени наночастици.

Като особено важен определям извода, направен на базата на резултатите от дисертацията, относно ефектите от включването на диамантените наночастици върху механичните характеристики на органосилоксана, което позволява постигането на по-високи стойности на модула на еластичност и по-изчистена моделна система за изследване влиянието на еластичността върху клетъчното поведение.

Приносите в определяща степен са дело на кандидата. Дисертационният труд е подготвен на високо научно ниво и отговаря на чл.27, ал.(1) и ал.(2) от Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България за придобиване на образователната и научна степен „доктор“, както и на вътрешните нормативни документи за приложението на горепосочения закон в Българската академия на науките и в Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.

Публикации по дисертацията

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 4 (четири) научни статии отпечатани в реферирани научни издания и 1 (една) глава от научната поредица на Elsevier „Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes“. В четири от публикациите дисертантката е първи автор. Две от статиите са публикувани в издания с импакт-фактор. При участието си в шест научни форума, М. Керемидарска е представила седем доклада (четири постерни доклада и три кратки научни съобщения) с получените в рамките на дисертацията резултати. Забелязани са две независими цитирания в чуждестранни научни издания на една от работите в списание с импакт-фактор. Така изброените наукометрични данни надхвърлят нормативните изисквания за присъждане на научната и образователна степен „доктор“, разписани в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБФБМИ – БАН.

Автореферат

Авторефератът е изготвен съгласно установените изисквания. Текстът на автореферата достоверно отразява съдържанието на дисертационния труд и представя основните резултати, заключенията и приносите на дисертанта, списъка с научните трудове, свързани с дисертацията, както и подробна информация за участията в научни форуми, на които са представени резултатите, докладвани в дисертационния труд. В автореферата са посочени и забелязаните независими цитирания на някои от публикуваните резултати от дисертацията.

Критични бележки, препоръки и въпроси

Освен отбелязаните по-горе препоръки относно някои допълнения в текста на изложението, други особени критични бележки по дисертацията нямам. Някои съкращения, използвани в текста на дисертацията са на български език, а други – на английски, като в списъка на съкращенията, поместен в началото на дисертационния труд, някои от термините са преведени, а други – оставени в английския им вариант. Добре би било, значението на английските термини (с изключение на названията на химическите съединения) да бъде изписано и на двата езика (напр. DSI, ERK, IIT и др.), а съкращенията – подредени по азбучен ред. Списък с фигурите и таблиците би спомогнал за по-лесното намиране на представянето и обсъждането на резултатите в текста на дисертацията.

Тези коментари не променят изцяло положителното ми впечатление от дисертационния труд на Милена Керемидарска.

Въпроси:

Поставените въпроси целят изясняването на някои аспекти в интерпретацията на оригиналния материал, представен в дисертационния труд.

1. Интересно би било да се коментира на какво се дължи намалението в броя адхезирали МСК в случая на нелегиран с DND-частици полимер след покриването му с фибронектин (Фиг. 22). Какви заключения могат да бъдат направени от това наблюдение в светлината на паралелно установеното нарастване на средната площ на разстилане на прикрепените МСК (Фиг. 23)?
2. Най-голямо количество и най-добре формирани са актиновите стрес-фибри на клетките върху 2-DND/PPHMDS субстрата, получен по втория подход, а именно чрез отлагане и допълнителна плазмена поляризация на DND върху предварително плазмено-полимеризиран силоксанов слой. Може ли този резултат да бъде свързан с установената неколкостранно по-висока грапавост на субстрата в сравнение с този, получен при първия метод (Фиг. 19)?

3. В рамките на дисертационния труд правени ли са независими серии от измервания при използване на различни PDMS-подложки с еднакъв състав и механични свойства с цел, да се изключат нежелани ефекти от влиянието на евентуални химически фактори върху адхезивното поведение на клетките?
4. Установените различия в динамиката на клетъчния растеж при двата вида изследвани плазмено полимеризирани композитни материала могат ли да бъдат от полза при избора на подходящ биоматериал в имплантологията?
5. В заключение на резултатите, получени за взаимодействието на МСК с PDMS еластомери с различна твърдост, може ли да се обобщи, че в изследваните случаи повърхностната хидрофилност има приоритет пред фактора еластичност на субстрата?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение на гореизложеното и отчитайки оригиналността на научните приноси, давам своята висока **положителна оценка** за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и приноси на дисертанта. Рецензираната дисертация съдържа научни резултати, които представляват оригинален принос в мембранната биофизика и показва, че кандидатът притежава задълбочени знания по научната специалност „Биофизика“, както и развити способности за самостоятелни научни изследвания. Изложеното дотук ми дава основание да препоръчам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на **Милена Любомирова Керемидарска** по научната специалност **01.06.08 „Биофизика“**, професионално направление „Биологически науки“, шифър 4.3.

04.10.2016 г.
Гр. София

Изготвила:

/доц. д-р Виктория В. Виткова/