

404.10/13.8.15

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Елена Николаева Стоянова-Петрова, озаглавен "Получаване и характеристика на индуцирани плурипотентни стволови клетки", представен за получаване на научната и образователна степен "Доктор"

от чл. кор. проф. Румен Панков дбн, катедра „Цитология, хистология и ембриология“, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Член на научно жури, съгласно заповед № 212/12.06.2015 на Директора на Института по Биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“ при БАН за получаване на образователната и научна степен "доктор", професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Имунология“

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Демонстрираната от групата на Яманака от университета в Киото, Япония, възможност за превръщане на диференцираните телесни клетки в неспециализирани, плурипотентни клетки е едно от най-съществените постижения на съвременната биологична наука. Възможността за контролирано „преобръщане“ на естествено предопределената посока в развитието на клетките от недиференцирано към диференцирано състояние, създаде лабораторен аналог на популярните ембрионални стволови клетки и разкри неподозирани досега възможности за нови научни изследвания, разработване на съвременни лекарствени форми и дизайн на нови, по-ефикасни клетъчни терапии за персонализираната регенеративна медицина. При това, предложената от Яманака технология напълно избягва сериозните етични въпроси, които съпътстват получаването на ембрионалните стволови клетки. Всичко това предопредели и огромният интерес към получените от Яманака клетки, означени като индуцирани плурипотентни стволови клетки (иПСК).

Независимо от мащабните изследвания върху иПСК от тяхното създаване през 2006 година досега, технологията за получаването им все още не е усъвършенствана достатъчно и продължава да бъде една от най-интензивно проучваните области. Основен проблем остава ниската ефективност на метода, като за преодоляването ѝ са предложени различни подходи, вариращи от промени в комбинациите от препрограмиращите транскрипционни фактори до използване на агенти, повлияващи хроматиновата структура и епигенетичното състояние. Представената ми за

рецензиране дисертационна работа третира тези проблеми и това ми дава основание да я определя като актуална и значима.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертацията на Елена Стоянова-Петрова е компактна и е структурирана в девет раздела, като основните от тях следват общоприетата схема – литературен обзор, цели и задачи, методична част, резултати, обсъждане, изводи, приноси и библиография. Тя включва 115 страници, 31 фигури, 3 таблици и литература от 248 заглавия на английски език, съществена част от които са публикувани през последните десет години.

Заглавието на дисертацията е добре подбрано и ясно и точно дефинира периметъра на проведените изследвания - получаване и характеристика на индуцирани плурипотентни стволови клетки. Специфичните задачи логично следват последователността на описаната от Яманака технология за получаване на иПСК, като намирам задачи 3 и 4 за най-интересни, защото те излизат от кръга на необходимите потвърдителни експерименти и залагат възможност за установяване на нови научни факти, свързани с повишаване ефективността на метода чрез специфична селекция на препрограмираните клетки и използване на епигенетични модулатори.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За изпълнение на поставените задачи са използвани широк набор от модерни и класически методи на молекулярната биология (изолиране и характеризирание на плазмидни ДНКи, изолиране на РНК, RT-PCR и др), клетъчната биология (клетъчно култивиране, изолиране на първични култури от ембрионални фибробласти, ретровирусна инфекция и др) и имунологията (индиректна имуофлуоресценция). Усвоени са и някои по-специфични методи, като получаване на ембрионни телца, имунологично-базирано магнитно сепариране на клетки и др. Информацията за използваните материали е изчерпателна и прегледно е представена в табличен вид. Техниките са описани ясно и подробно, могат да бъдат възпроизведени без използването на други източници и оставят впечатление за много добра професионална подготовка на докторантката. Адекватността на избраните и използвани методи е добра гаранция за постигане на поставените цели.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и изводи

Литературният обзор е представен стегнато, като са засегнати всички по-важни теми, имащи отношение към дисертационния труд. Представената информация е подходящо илюстрирана с 4 фигури и 2 таблици. Тя включва раздели, посветени на общата класификация на стволите клетки, на видовете плурипотентни стволови клетки, на терапевтичния потенциал на иПСК и на начините за получаването им, особеностите при култивирането им и на критериите, използвани при характеризирането им. Изложението е ясно, без излишно фактологично утежняване и показва способността на докторантката за компетентно и професионално боравене с наличната научна информация. Въпреки, че няма пряко отношение към експерименталните задачи на дисертацията, считам че обзорът би спечелил от включването на раздел, посветен на различията между ембрионалните стволови клетки и иПСК. Подобна информация би допринесла за по-коректното възприемане не само на позитивните възможности, които предоставят иПСК, но и на проблемите, свързани с някои от регистрираните недостатъци на този вид плурипотентни клетки.

Получените резултати стриктно следват поставените задачи, като логично, първият раздел е посветен на изолиране и характеризиране на ретровирусните вектори, носещи гените за транскрипционните фактори ОКТ4(хибриден вариант, свързан с GFP), SOX2, C-MYC и KLF4, избрани в изследването за препрограмиране на човешки фибробласти от линията ВJ. След оптимизиране на процедурите по получаване на вирусните частици и уточняване схемата на ретровирусната трансдукция са изолирани първите клонове от препрограмирани клетки – iBJ1 до iBJ5. Поради ниските нива на експресия на основните плурипотентни маркери ОКТ4 и NANOG (демонстрирана чрез PCR анализ на ендогенната експресия) тези клонове са използвани и за по-нататъшно селектиране, основано на експресията на трансгенния *oct4* (който носи и резистентност спрямо антибиотика пуромицин) и експресията на мембранный маркер TRA-1-60 (чрез магнитно сортиране). Тази оригинална комбинация от два селекционни „натиска“ довежда до изолирането на още няколко клона препрограмирани клетки, от които най-интересен е OT-iBJ2, тъй като в него са регистрирани най-високите нива на експресия на ендогенни ОКТ4 и NANOG.

Доколкото приложения метод за получаване на иПСК показва ниска ефективност – от 0.005% до 0.01%, докторантката използва нов цикъл на продукция, при който включва епигенетичния модулатор валпроева киселина в комбинация с

мощния антиоксидант аскорбинова киселина. Приложената схема довежда до значително повишаване ефективността на препрограмиране – до 0.06% и изолиране на клонове VA-iBJ1 до VA-iBJ6. Повечето от тези клонове показват значително по-високи нива на експресия на ендогенните ОКТ4 и NANOG от предходно изолираните и недвусмислено демонстрират преимуществата на така разработената схема за получаване на иПСК. Плурипотентността на основните изолирани клонове от иПСК е доказана чрез способността им да формират деривати на трите зародишни пласта след формиране на ембрионни телца.

Получените резултати са обсъдени задълбочено и критично, като са направени три извода и са изведени три приноса. Имайки предвид представените научни резултати приемам изводите и приносите за напълно коректни.

Във връзка с представените резултати бих искал да задам и два въпроса:

1. От литературните данни е добре известно, че за поддържане на плурипотентността е важно не само присъствието на ОКТ4, но и нивата на неговата експресия, като отклонения към повишена или понижена експресия са свързани с процеси на диференциация. В изолираните клонове, нивата на експресия на ОКТ4 варират, както е посочено на стр. 71 „от 3 до 50 пъти” и все пак всички изследвани клонове са поддържани в недиференцирано състояние. Може ли да предложите обяснение на този факт?

2. Клон VA-iBJ1 не показва установими нива на експресия на NANOG съгласно данните от индиректната имунофлуоресценция. Известни ли са в литературата други подобни случаи при които плурипотентното състояние на иПСК може да бъде поддържано и без експресия на NANOG?

Дисертационният труд е изработен старателно, написан е на хубав и правилен български език, като прави добро впечатление липсата на технически грешки. Фигурите, съдържащи микрофотографии са с високо качество, като различните увеличения са правилно аранжирани и много добре илюстрират дискутираните факти.

Резултатите от дисертацията са публикувани в две научни статии и са докладвани на три научни форума.

Авторефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Общо, получените от Елена Стоянова-Петрова резултати представляват принос във въвеждането и усъвършенстването на технологията за получаване на индуцирани плурипотентни клетки от човешки фибробласти.

Представеният труд характеризира своята авторка като компетентен и изграден изследовател, който има знанията, уменията и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на имунологията. Това ми дава основание убедено да дам своята положителна оценка и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури, назначено със заповед № 212/12.06.2015 да присъди на г-жа Елена Николаева Стоянова-Петрова образователната и научна степен "Доктор".

11.08.2015 год.

Рецензент:

/чл. кор. проф. дбн Р. Панков/