

405-10/13.8.15

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Магдалена Иванова Чорбаджиева

Катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ "Св. Кл. Охридски"

Относно: дисертационен труд на задочен докторант **Елена Николаева Стоянова - Петрова** на тема „Получаване и характеристика на индуцирани плурипотентни стволови клетки“ за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** по научната специалност **„Имунология“**

Плурипотентните стволови клетки притежават забележителна способност за самообновяване, както и за диференциране в клетъчни видове от трите зародишни слоеве в отговор на екстрацелуларни сигнали. Така те са не само ценно изследователско средство за разбиране на клетъчното репрограмане и заболяванията при човека, но също така притежават огромен потенциал за регенеративната медицина, който обаче е ограничен от редица практически и етични проблеми. Елегантните опити на групата на Yamanaka преди 9 години показаха, че соматични клетки от бозайници могат да бъдат репрограмирани до плурипотентно състояние (наречени индуцирани плурипотентни стволови клетки - иПСК) чрез ектопична експресия само на няколко транскрипционни фактора, отговорни за плурипотентното състояние на ембрионалните стволови клетки. Това откритие повдигна фундаментални въпроси относно механизмите, по които транскрипционните фактори повлияват епигенетичната информация и потенциала за диференциация на клетките по време на репрограмането и нормалното развитие. В допълнение, технологията на иПСК снабди учените с уникален инструмент за получаване на стволови клетки, специфични за различни заболявания и тяхното използване за третиране на дегенеративни нарушения с автоложни клетки. Тези проблеми предизвикват изключително голям изследователски интерес, за който свидетелства експоненциално нарастващият брой на научните публикации и това определя актуалността на дисертационния труд на Елена Стоянова, посветен на получаване на иПСК от човешки фибробластни клетки чрез трансфекция на последните с транскрипционните фактори Oct4, Sox2, KLF4 и c-Myc.

Литературният обзор от 31 машинописни страници е написан компетентно, на добър научен език и стил и показва доброто познаване на литературата по изследвания проблем. В логична последователност подробно са разгледани класификацията на отделните видове стволови клетки в зависимост от потенциала им за диференциация

или техния произход наред с тяхната функционална и молекулярна характеристика. Подобавашо внимание е отделено на иПСК, включително на тяхното приложение в *in vitro* моделиране на заболявания, тестиране на лекарствени средства и в регенеративната медицина. Цял един раздел е посветен на различните експериментални подходи за получаване на иПСК, като особено внимание е отделено на сравнителния анализ на двата основни подхода – интегративен и неинтегративен метод по отношение на тяхната ефективност. В допълнение, освен въвеждането на 4-те транскрипционни фактори на Yamanaka, което е общоприет стандарт, е представено и използването на други фактори за успешно репрограмане, като малки молекули от рода на валпроева киселина, аскорбинова киселина, бутират, 5-азациитидин и др. Особено внимание е отделено също така на критериите, които се прилагат при идентифициране на напълно препрограмирани клетки, включващи характерна морфология, експресия на определени повърхностни антигени, идентификация на гените, свързани с индукцията и поддържането на плурипотентно състояние - Oct4, Sox2 и Nanog, допълнени с Klf4. Цитираната литература обхваща 248 литературни източника, повечето от които са от последните 5-10 години. От литературния преглед произтичат логично целите и задачите на дисертационния труд. Методичната част е написана коректно и достатъчно подробно и дава нагледна представа за големия брой съвременни молекулярни техники, усвоени от докторантката.

Основните резултати, получени при експериментите, са отразени в раздел Резултати. Те са документирани убедително с 27 фигури и една таблица и са адекватно интерпретирани. За получаване на иПСК от човешки фибробласти (линия VJ) удачно е избран интегративен метод, базиран на MoMLV ретровирусна система поради високата му ефективност на репрограмане. В хронологичен вид са представени промяната в морфологията и наличието на GFP експресия под промотора на Oct4 като показатели за успешна трансфекция на HEK 293T/17 клетките, производители на вирусните частици. В допълнение, чрез индиректна имунофлуоресценция е валидирана способността за експресия на векторите за останалите три транскрипционни фактора. Първоначално неуспешните опити за трансфекция са преодолени с модификация на метода и след успешна ретровирусна трансфекция на човешки фибробластни клетки с 4-те транскрипционни фактора Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4, са получени репрограмирани фибробластни клетки с ефективност 0.005%-0.01%. Ниската ефективност на репрограмане е предпоставка обаче за ниска вероятност за изолиране на иПСК, което довежда до разработване на схема на селекция на препрограмирани

фибробластни клетки, базирана на едновременната експресия на транскрипционен фактор Oct4 и мембранната молекула TRA-1-60, която се използва за доказване на плюрипотентни клетки. В резултат от прилагането на тази схема са отбрани отделни клонове и е проведен количествен PCR анализ за установяване нивото на експресия на ендогените Oct4 и Nanog, като са сравнени клонове от клетки, получени от различни етапи на селекцията. Резултатите показват най-висока експресия на двата ендогена в клоновете, експресиращи едновременно Oct4 и TRA-1-60. В допълнение е проведена индиректна имунофлуоресценция, която доказва наличието на Oct4, Nanog и TRA-1-60 на ниво белтък. Така получените резултати обаче не са още доказателство за напълно препрограмиране на клетките. Едно такова доказателство е поддържането на експресия на плюрипотентните фактори след продължително култивиране на клетките, което довежда до култивиране на репрограмираните фибробластни клетки за 170 дни след начало на инфекцията и проверка на експресията на Oct4, Nanog, KLF4, Sox2 и SSEA4 чрез индиректна имунофлуоресценция. Въпреки положителните резултати, показващи изолване на клетки с плюрипотентни характеристики, ефективността на репрограмиране остава ниска и това налага търсене на допълнителни подходи за повишаване на продукцията на иПСК чрез епигенетични модулатори като валпроева и аскорбинова киселини. Колониите, отбрани след едновременното въздействие на двете киселини, също са подложени на характеризиране по гореописаните методи за установяване на препрограмирани клетки с положителен резултат. Следва да се отбележи, че се наблюдава 6-кратно повишаване на ефективността на препрограмиране след прилагане на този подход. И накрая, докторантката провежда изследване на диференциационния потенциал на препрограмираните клетки, използвайки *in vivo* тест за диференциация чрез имунофлуоресценция с разнообразни комбинации от диференциационни маркери като VIMENTIN, NESTIN, A-AKTININ, DESMIN, GATA4 и AFP. Обобщавайки резултатите от проведените експерименти, може да се заключи, че въведените промени в протоколите за препрограмиране и ранна селекция на иПСК водят до бърза и икономически изгодна процедура за получаване и подбор на иПСК.

Изводите от работата са формулирани в съответствие с получените експериментални резултати. Завършен е един етап от изследователската работа, който е предпоставка за по-задълбочено изучаване на механизмите на клетъчно репрограмиране. В тази връзка бих желала да задам следния въпрос - колко далеч са още индуцираните плюрипотентни стволови клетки от терапевтичните приложения, кои са основните препятствия и какви са евентуалните начини те да бъдат преодолени?

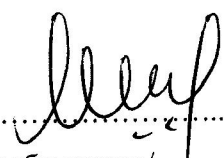
Резултатите от изследователската работа са публикувани в 2 статии – една в българско списание и 1 в международно списание с импакт фактор. И в двете публикации докторантката е на първо място, което е доказателство за нейния личен принос както в изработването, така и в публикуването на получените резултати. Докторантката е участвала с част от резултатите от дисертационния си труд в 2 международни и 1 национална конференции.

Авторефератът съдържа основните резултати и изводи и по обем и съдържание отговаря на изискванията.

В заключение: Считаю, че дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение. Докторантката Елена Стоянова-Петрова се е справила отлично с всички планирани задачи и е развила критичен подход при представяне и обсъждане на резултатите от научните си изследвания. Тя е изграден самостоятелен изследовател със значителен научно-изследователски опит в областта на клетъчната и молекулярната биология, овладял широк набор от съвременни молекулярно-биологични техники.

Въз основа на гореизложеното си позволявам да пледирам пред Уважаемите Членове на Научното жури да гласуват присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ на Елена Стоянова-Петрова.

11.08.2015 г.
гр. София

Изготвил становището: 
/проф. д-р Магдалена Чорбаджиева/