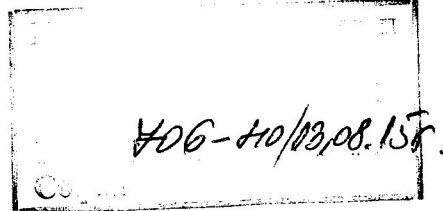


СТАНОВИЩЕ



на дисертационния труд на Елена Николаева Стоянова-Петрова на тема: „Получаване и характеристика на индуцирани плурипотентни стволови клетки“ за присъждане на ОНС „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Имунология“ (шифър 01.06.23)

от проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Академик Румен Цанев“ – БАН

Откритието, че геномът на соматична клетка може да бъде препрограмиран от ооцитна цитоплазма до тотипотентно състояние е революционно по своята същност. То категорично показва, че появата на голямо разнообразие от клетъчни фенотипове в хода на индивидуалното развитие на организмите не е съпроводено с генетични, а с епигенетични изменения. Това от своя страна автоматично порождает надеждата, че без пряка намеса в генома е възможно трансформиране на един клетъчен тип в друг за целите на персонализираната и регенеративна медицина. Макар и бавно тази възможност се превръща в реалност чрез преодоляване на редица трудности, свързани с непълната функционална характеристика на човешкия геном, ниската ефективност на препрограмиране на диференцираните клетки, нестабилно във времето препрограмиране и др. Дисертацията на Елена Стоянова-Петрова се присъединява към усилията за намиране на ефективни подходи за получаване на плурипотентни стволови клетки, които имат потенциала да се диференцират в клетки от трите зародишни листа, т. е. теоретично във всеки желан клетъчен фенотип.

Елена ни предлага една изключително добре написана и стилна дисертация, както в езиково и съдържателно, така и в естетично отношение. Изложението е стегнато, ясно и логично като това важи за всеки раздел на дисертацията. Обзорът акцентира върху литературни данни (248 цитата), които убеждават читателя в необходимостта от провеждане на изследванията и в този смисъл логично води към поставените цел и задачи. Методите са адекватни, изчерпателно описани и показателни за добрата методична подготовка на докторантката. Към този раздел отправям несъществената забележка, че за разделянето на ДНК фрагменти с молекулна маса между 5 и 20 кб 1.5% агарозен гел е твърде концентриран. Удоволствие е да се чете глава „Резултати“, където данните са подкрепени с качествен илюстративен материал. Разбира се винаги могат да се намерят досадни (и неважни) пропуски като например Фиг. 19 Б изглежда е цитирана в текста като Фиг. 20 Б (стр. 70), а Фиг. 25 като Фиг. 28 (стр. 76); на стр. 77 под OT-iBJ3/4 вероятно се разбира VA-iBJ3/4. Обсъждането е премерено и в съгласие със собствените и литературни данни. Формулирани са по три лаконични, но много точни изводи и приноси.

Докторантката си поставя за цел да получи стволови клетки от човешки фибробласти чрез подхода за индуциране на плурипотентно състояние. За тази цел, чрез ретровирусна интеграция, тя въвежда в човешките фибробласти гени за четири препрограмиращи транскрипционни фактори. Първоначално използваната методика за въвеждане на вирусните частици води до 50% смъртност на клетките, което налага нейното успешно модифициране, снижаващо леталността до 20%. За отбор на плурипотентни клетки е използван морфологичен подход, следван от оригинална методика на двуетапна селекция. В първия етап клетките се отбират по антибиотична устойчивост, а във втория - по експресията на специфичен повърхностен антиген (TRA-1-60). Чрез използването на този подход е постигната ефективност на препрограмиране между 0.005 и 0.01%, която е съпоставима с тази, получена от други изследователи за човешки фибробласти. За повишаване на ефективността, след вирусната инфекция докторантката култивира клетките в присъствие на комбинация от валпроева

(епигенетичен модулатор) и аскорбинова киселина като оптимизира описаните в литературата протоколи. Така ефективността на препрограмиране нараства около 6 пъти (до 0.06%). Плурипотентното състояние на клетките и след двата подхода е потвърдено чрез морфологични, биохимични (алкална фосфатаза) и молекулярно-биологични изследвания за доказване експресията на трансдуциращите маркери (PCR и флуоресцентна микроскопия). Отбрани са общо 5 клона, за които убедително е показано, че формират ембрионни телца и експресират маркери, характерни за клетки от трите зародишни пласта (екто-, мезо- и ендодерма), с което целта на дисертацията е постигната.

Въпроси:

1. За единия от четирите препрограмиращи фактори (с-MYC) в Обсъждането (стр. 88) пише „...не беше възможно получаването на резултат за експресията на с-MYC“. В какво се изразява тази „невъзможност“? Какво трябва да разбираме - че с-MYC не се експресира или че не е ясно дали се експресира?
2. Твърди се, че чрез RT-PCR е изследвана експресията на *ендогените* за препрограмиращите транскрипционни фактори. Трябва ли да разбираме, че за това твърдение се разчита на заглушаване експресията на трансгените или използваните праймери за RT-PCR могат да разграничат трансген от ендеген?
3. Ефективността на препрограмиране е отчетена на базата на морфология на колонии, съгласно която при втория подход (валпроева киселина) са идентифицирани 31 колонии (стр. 69, Резултати). В Обсъждането (стр. 93) пише: „От всички проведени експерименти бяха изолирани 18 клона от препрограмирани клетки“. По какво тези 18 клона се различават от останалите, селектирани морфологично, и не трябва ли ефективността на препрограмиране да се изчислява на базата на броя реално препрограмирани клонове?

Във връзка с изследванията, включени в дисертацията, са публикувани две статии в научни списания – едно българско и едно международно с импакт-фактор. Резултатите са представени още чрез два постера и един доклад (изнесен от докторантката) на три научни мероприятия - две международни и едно с международно участие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Елена Стоянова-Петрова ни представя една дисертация в изключително интересно и перспективно направление на съвременната клетъчната биология, на което се възлагат големи надежди за бъдещо лечение на нелечими засега заболявания. Дисертацията е изработена, написана и оформена професионално, което показва че тя е изпълнила своята образователна мисия. Представените в нея резултати са популяризирани сред научните среди съгласно изискванията на ЗРАСРБ и на допълнителните критерии на ИБИР-БАН за допускане до защита на дисертационен труд. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на Научното Жури да излезе с предложение до НС на ИБИР-БАН за присъждане на ОНС „Доктор“ на Елена Николаева Стоянова-Петрова.

13 август, 2015 г.



проф. Р. Миронова