

СТАНОВИЩЕ

за дисертационен труд на Борислав Емилов Арабаджиев
за присъждане на образователна и научна степен “доктор”
на тема: “Изолиране и характеризирание на линии от човешки ембрионални
стволови клетки”

Научен ръководител: чл. кор. проф. Румен Панков, дбн
Катедра ЦИТОЛОГИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ
Биологически факултет,
СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “Св. Климент Охридски”

От доц. Милена Сергеева Мурджева, секция “Молекулярна имунология”,
Институт по биология и имунология на размножаването, БАН

Актуалност на дисертационния труд

Ембрионалните стволови клетки могат да намерят изключително широко приложение, дори без да споменаваме потенциала им за терапии в регенеративната медицина. Поради способността им да се диференцират теоретично във всеки тип клетки на възрастния организъм бъдещето им използване за възстановяване след инфаркти, дегенеративни заболявания и други е в етап на клинични проучвания. Приложението им във фармацевтичната индустрия за тестиране на нови лекарствени субстанции, както и като моделни системи за изучаване на различни заболявания вече е факт. В този случай е необходимо получаване на ембрионални стволови клетки от ембриони с конкретни дефицити или доказани генетични дефекти, както и на специфично диференцирани клетки от тях. Развитието на техниката за получаване, характеристика и диференциране на ембрионални стволови клетки и получаването на българска линия е съществен принос и предпоставка за бъдещо развитие на това научно направление в България, както и за приложение на терапии, базирани на ембрионални стволови клетки.

Литературна осведоменост

В литературния обзор е обобщена наличната литература относно ранно ембрионално развитие; стволови клетки; молекулярни механизми на плурипотентността; маркери, характеризиращи ембрионални стволови клетки. В следващата част теоретично са разгледани подходите и методите за изолиране, култивиране и съхраняване на линии от човешки ембрионални стволови клетки и за диференциация на ембрионални стволови клетки. Като обобщение са представени аргументите на авторите за необходимостта от създаване на нови линии от човешки ембрионални стволови клетки. Обзорът е

изключително добре онагледен с фигури от актуалната литература. Не всички от тях са цитирани, но този пропуск, както и не малкото технически и правописни грешки не намаляват съществено качествата на обзора.

Цел, задачи и методи

Целта е поставена ясно и конкретно, от нея логично произтичат задачите. Описаните методи са представени ясно и подробно, но липсва информация за използваните антители за имунофлуоресценция, има такава само за антителата използвани за флоуцитометрия. Не е описано споменатото в резултатите флоуцитометрично сортиране на амниотичните стволови клетки, всъщност в материали и методи липсва каквато и да е информация по изолирането и характеристиката на тези клетки, като такава информация е представена съвсем кратко в резултатите. Пропусната е и информацията относно желатинирането на плаките и стъклата за култивиране на клетките.

Резултати и дискусия

Използвани са 24 дарени остатъчни ембриона на различен стадий на развитие, от които са получени следните линии ембрионални стволови клетки: VABE1 (чрез имунохимия) и VABE2 (чрез механично изолиране на вътрешната клетъчна маса), получени от ембриони на стадий късен бластоцист; от ембрион на стадий морула е получена линията VAM1. Най-стабилна по отношение на поддържане на плурипотентното състояние е линията VABE1, повечето експерименти в дисертацията по-нататък са изпълнени с нея. Само по себе си началните експерименти в нова област, са доста времеемки и енергоемки, работата по поддържане на ембрионални стволови клетки в недиференцирано състояние изисква много съпътстващи процедури (поддържащи клетки, които да бъдат готови в необходимия момент, митомизирането им, пасажирването на колонии от ембрионални стволови клетки чрез микродисекция), а също така натрупването на опит и умения. Смятам получаването на линии от ембрионални стволови клетки за достатъчен атестат за изградените умения за клетъчно култивиране у докторанта.

Оптимизирани са протоколи по криоконсервация на колонии от ембрионални стволови клетки, които са верифицирани по площта живи клетки след размразяването, в случая когато са замразени плаки за култивиране. Изследвана е експресията на плурипотентни маркери чрез имунофлуоресцентна детекция на експресията на Oct-4, SSEA4 и Tra-1-60 (в линиите VABE1 и VAM1) и чрез RT-PCR на Nanog, Oct-4 и Sox2 (в линиите VABE1 и VABE2). Показана е и позитивна реакция за алкална фосфатаза в линиите VABE1 и

VAM1. Представен е цитогенетичен анализ на линията VABE1, като тя показва нормален кариотип, което е добро постижение за ембрионална клетъчна линия – повечето линии на пазара са с триплоидии, поради факта, че са получени от дефектни ембриони, както и поради натрупване на мутации при продължителното култивиране. Потвърден е мъжкият пол на линиите VABE1 и VABE2 чрез амплификация на гена за амелогенин. Показана е ниската експресия на HLA-ABC и липсата на експресия HLA-DR от VABE1 чрез имунофлуцитометрия. Авторите коментират и липса на HLA-G експресия, без да показват негативните резултати. След доказантата плурипотентност на линията VABE1, втората част логично е фокусирана върху експерименти по нейната диференциация. Паралелно са разгледани спонтанна и насочена диференциация към невроектодерма (неврони) и към мезодерма (кардиомиоцити). Особено внимание е отделено на диференциацията към герминативни клетки, като тук е предложен и оригинален подход, който очевидно дава добри резултати. Представени са пет извода и три приноса, които напълно приемам.

Забележки и въпроси: Не са указани увеличението на част от микрофотографиите (фиг. 2, 3, 4, 5, 44, 45). Липсват подробности за линията НТВ-9. Не ми стана ясно решението да бъде използвана супернатанта от нея в експериментите за диференциране дали е основано на литературни данни или е оригинално. Бихте ли представили по-пълна характеристика на използваните амниотични клетки и супернатанта от тях. Може ли да бъде използвана замразена супернатанта?

Научни публикации във връзка с дисертацията

Представени са пет публикации, свързани с дисертацията, както и три участия на научни конференции. В четири от публикациите Борислав Арабаджиев е първи автор. Три от публикациите са с импакт фактор. Според представени от автора данни са забелязани 16 цитирания, според Google Scholar към настоящия момент (25 юни 2016) са отбелязани 18 цитирания без автоцитирания. Това е още един атестат за актуалността и важността на включените в дисертацията данни. Въпреки, че авторът не коментира широко собствените си резултати в контекста на наличната литература по темата, отбелязаните цитирания безспорно показват интегрираността на работата в съвременната литература по темата.

Заклучение

В заключение искам уверено да изразя своето становище, че дисертационният труд на Борислав Арабаджиев отговаря на научните и образователни критерии за докторска степен, както и на допълнителните критерии на Софийския университет за

публикационна дейност, свързана с дисертацията. Получената ембрионална стволова линия VABE1 е характеризирана по отношение на кариотип, експресия на плюрипотентни маркери и е диференцирана в посока ектодермални, мезодермални и герминативни клетки. Разработен е оригинален протокол за диференциация на ембрионалните стволови клетки от линия VABE 1 в герминативни клетки. Убедено препоръчвам на членовете на Научното жури да вземат решение за присъждане на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност 01.06.18 Клетъчна биология на господин Арабаджиев.

26 юни 2016

София

Доц. Милена Мурджева