

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научната степен

Автор на дисертационния труд: Теодора Кирилова Тасева, специалист-биолог в Институт по физиология на растенията и генетика към Българска академия на науките

Тема на дисертационния труд: „Влияние на етанола върху ембрионалното развитие, експресията и метилационния статус на импринтирания локус Igf2/H19 при мишки“

Рецензент: доц. д-р Светослав Георгиев Димов, ръководител Катедра „Генетика“, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

1. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура.

Дисертационният труд е развит в рамките на 174 страници, като е структуриран по стандартен начин и включва разделите: увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, като отделно са формулирани поотделно изводи и приноси и завършва с богата литературна справка от внушителните 380 източника, между които процентът на тези от последните 10 години е внушителен.

Уводът е представен в рамките на една страница и половина и кратко и ясно представя научния интерес към темата и получените резултати.

Литературният обзор е развит в рамките на 37 страници. Той показва дълбокото навлизане на докторантката в проблематиката, както и доброто ѝ боравене и способност за анализиране и интерпретиране на специализираната научна информация по темата. В този раздел прави изключително добро впечатление структурирането на тематичните раздели, които са представени в много добра и лесна за възприемане логическа последователност. Условно той може да бъде смислово разделен на 4 части. В първата се разглеждат феталния алкохолен спектър от разстройства (ФАСР), причините за варибилността на ФАСР и механизмите на ФАСР. Във втората – типовете епигенетични модификации и механизмите им, обхващащи както различните типове хроматинови модификации, така и метилирането на самата ДНК. Третата част е отделена на геномния импринтинг и в частност на локуса Igf2/H19, предмет на дисертационния труд, а четвъртата – на промените в епигенетичния статус през ембрионалното развитие, също обект на изследване в представения труд. Изложението на този раздел е илюстрирано с 6 фигури.

Цел и задачи. Поставена е една ясно формулирана цел, за чието изпълнение са предвидени пет експериментални задачи, чието осъществяване е напълно достатъчно за постигането ѝ. Към този раздел имам една единствена забележка – въвеждащата част, която в

голяма степен повтаря вече изложени в увода обосновки. Тя по мое мнение се явява излишна в такъв голям обем.

Материали и методи. Разделът е развит в рамките на 22 страници. Обхваща експерименталните техники, които докторантката е използвала при изработването на дисертационния труд, и включва: моделна система на мишки от линията C57BL/6, методи за третиране на бластоцисти, ембриони и плаценти, методи за изолиране на ДНК и РНК, методи за обратна транскрипция, методи за изследване на генната експресия, методи, имащи за цел изследването на метилационния статус на ДНК и методи за статистически анализ на получените резултати. Всички методи са описани подробно и по начин, който позволява тяхното възпроизводство от изследователи, които ги прилагат за пръв път. Отделно добро впечатление прави и фактът, че в началото на описанието на всяка техника има кратка въвеждаща част, която обяснява принципа и приложението на метода, което улеснява още повече евентуалното му възпроизводство. От изложението на този раздел стигам до извода, че докторантката без съмнение е овладяла до съвършенство методите и техниките. Обемът им отговаря напълно и дори надвишава критериите за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Разделът съдържа 6 таблици и 6 фигури. Към този раздел нямам забележки.

Резултати. Разделът е развит в рамките на 36 страници, като получените експериментални резултати са удачно групирани смислово в следните подраздели: резултати от оптимизиране на условията на култивиране, резултати от третиране с етанол на бластоцисти, ембриони и плаценти, резултати от количествена полимеразна верижна реакция за оценка на експресията на разглежданите в дисертационния труд гени, резултати от оценката на метилационния статус на локуса *Igf2/H19* и резултати от статистическата обработка на резултатите. В този раздел чудесно впечатление прави богатият илюстрационен материал, показващ нагледно изпълнението на поставените експериментални задачи и изразяващ се в 4 таблици и 42 фигури с много високо графично качество. Като цяло впечатленията ми от този основен за дисертацията раздел са изцяло положителни.

Обсъждане. Разделът е развит в рамките на 38 страници. Изложението се отличава с висока степен на задълбоченост в анализа на получените експериментални резултати и съпоставянето им с резултати на други изследователски групи по литературни данни. Обсъждат се получените данни за условия на култивиране *in vitro*, ефекта на етанола *in vitro*, предизвиканите от етанол промени в развитието на ембрионите и плацентите и влиянието му върху експресията на локуса *Igf2/H19*, както и върху метилационния му статус. Отделно в този раздел на дисертацията се прави обосновка на избора на референтните гени за количествената полимеразна верижна реакция, анализира се епигенетичния модел за регулацията на локуса *Igf2/H19*, дължащ се на метилирането на ДНК, и се обсъжда плацентата

като критично звено в ембриогенезата на основата на получените данни. Много добро впечатление правят следните неща:

1. Еманципацията на докторантката от предварителната работна хипотеза, тъй като получените експериментални данни потвърждават само част от нея, като тя не се страхува да подходи коректно, обсъждайки и приемайки и тези, които се отклоняват или разминават с нея;

2. Липсват повторения с раздел „Резултати“. Често пъти, когато „Резултати“ и „Обсъждане“ са изложени поотделно, възниква изкушението част от изложението в раздел „Резултати“ да се прехвърли и в дискусията. В този случай обаче обсъждането е направено много добре на основата на експерименталните резултати, без обаче да се наблюдават повторения;

3. Изключително умелото съпоставяне на собствени резултати с резултатите от литературните данни.

Като цяло изложението в този най-важен раздел свидетелства за това, че докторантката е един завършен изследовател, явяващ се едновременно добър експериментатор и аналитик.

Изводи и приноси. Формулирани са ясно и кратко 8 извода, като липсват приноси, формулирани като изводи. Изброени са и 6 приноса. В ясната им и точна формулировка е систематизирана научната значимост и актуалност на дисертационния труд.

2. Актуалност на разработения в дисертационния труд проблем в научно и научно-приложно отношение.

Темата на представения ми за разглеждане дисертационен труд се отличава с голяма актуалност на проблематиката – изследване на тератогенното въздействие на алкохола, дължащо се на епигенетични модификации на генома и в частност при импринтирания локус Igf2/H19 при мишките, които удачно са избрани като моделен обект, представлявайки бозайник, резултатите от който могат лесно да бъдат екстраполирани към човека поради споделянето на голям брой общи генетични и епигенетични механизми за регулация на развитието. Нейната научна значимост се подсилва и от факта, че болшинството от научните публикации във връзка с нея са относително стари, а в последните години може да се каже, че е несправедливо пренебрегвана, независимо от значимостта ѝ, включително и социална, във връзка с увеличаващата се прекомерна консумация на алкохол от млади хора в репродуктивна възраст и падащата възрастова граница на консуматорите на спиртни напитки до възраст, при която индивидуалното развитие все още продължава.

3. Познава ли дисертантът състоянието на проблема и оценява ли творчески литературния материал.

Изложението на литературния обзор свидетелства за дълбокото навлизане в материята и проблематика на дисертационния труд, като дисертантката се е запознала с най-новите към момента публикации по темата. Тя е подбрала широк набор от съвременни методи, които използва в своята работа за доказване на научните си хипотези, които без съмнение е овладяла, което свидетелства, че тя се явява един изключително добър експериментатор, разполагащ освен с дълбоки теоретични познания, така и владеещ умело „занаята“ на едни от най-новите достижения в молекулярната биология. Творческият ѝ подход обаче проличава най-добре в раздел „Обсъждане“, където тя съпоставя получените от нея данни с такива от научната литература, като същевременно ги интерпретира умело на висок научен стил и дори на моменти не се притеснява да оспорва твърдения от огромния набор от литературни източници, които е използвала.

4. Избраните методични подходи могат ли да дадат отговор на поставените цел и задачи на дисертационния труд.

Категорично да. Броят на експерименталните задачи е напълно достатъчен за осъществяването на поставената цел.

5. Кратка аналитична характеристика на естеството и достоверността на материала, върху който се градят приносите на дисертационния труд.

Въпреки факта, че локусът Igf2/H19 се явява учебнически пример за половоспецифичен генен сайлънсинг дължащ се на геномен импринтинг, изследванията за влиянието на етанола върху импринтния статус на този локус, както и неговия тератогенен ефект, при това в среда, в която все по-често се злоупотребява със спиртни напитки, особено от млади хора в репродуктивна възраст, са необяснимо изключително ограничени. Единственото изследване в тази област, което успя да намери и при което се използват като моделен обект миши ембриони, подложени на въздействие с етанол през предимлантационния период, е това на Наусок, което датира от преди повече от 6 години. Дисертантката коректно го цитира в своя труд, но трябва да се отбележи, че тя само частично се опира на някои от данните в него, тъй като използвания от нея набор от методологичен арсенал е значително по-широк и съвременен, поради което тя също би могла да бъде разглеждана като първопроходчик в тази област. Предвид на това авторството на получените резултати на подлежи на никакво съмнение.

6. В какво се заключават научните или научно-приложните приноси на дисертационния труд:

- ✓ **Формулиране и обосноваване на нов научен проблем.**

Както вече имах възможността да споделя, в противоречие с обществения интерес към негативните последици от консумацията на алкохол от млади хора и по-специално момичета в репродуктивна възраст, изследванията фокусирани върху влиянието му върху епигенетичния статус на генома, са изключително ограничени, особено тези, при които се използват като моделна система миши ембриони. В тази връзка темата на дисертацията, както и експерименталните подходи за постигането на целта ѝ, се явяват в значителна степен новаторски и оригинални.

✓ **Формулиране и обосноваване на нова теория и хипотеза.**

Както вече беше споменато, единственото подобно изследване в световен мащаб, което се открива в научната литература е това на Наусоук, но то засяга единствено изоставането в развитието на ембрионите и плацентата в резултат на помени в метилирането на импринтирания локус *Igf2/H19*. В своя труд дисертантката подхожда далеч по-многогранчиво и разширено методологично, изследвайки индуцираната промяна в растежа на бластоцисти, ембриони и плаценти и нивата на експресия и метилационния статус на локуса *Igf2/H19* след въздействие *in vivo* и *in vitro* по време на предимплантационния период на бременността, като стига до заключенията, че действието на етанола може да е противоположно – активиращо или забавящо, в зависимост от дозата, както и че се наблюдават промени в експресията и метилационния статус на *Igf2/H19*, вероятно дължащо се и обяснено с променени нива на някои ДНК-метилтрансферази.

✓ **Доказване с нови средства на съществени нови страни на съществуващи научни проблеми и теории.**

По мое мнение едни от най-съществените силни и оригинални страни на дисертационния труд се явява анализът на експресията на локуса *Igf2/H19* с помощта на количествена полимеразна верижна реакция в бластоцисти, ембриони и плаценти с използваните различни концентрации на етанол по време на третирането им, както и прилагането на полимеразна верижна реакция с метилационно-специфични праймери в подобен род изследване. Изборът на тези методи се явява изключително удачен и позволява получаването на по-добри за анализ данни в сравнение с използваната методология в единственото предходно подобно изследване, което споменах.

✓ **Създаване на нови класификации и методи за изследване**

В процеса на изработка на дисертационния труд, предвид на неговата тема, цел и особености създаването нови класификации и методи е неприложимо и неуместно. Същевременно обаче не мога да пропусна факта, че за постигането на целта на дисертацията е използвана уникална нова комбинация от различни методи за получаване и третиране на ембриони, бластоцисти и плаценти, методи за анализ на експресия с помощта на количествена

обратно-транскрипционна полимеразна верижна реакция, методи за изследване на метилационния статус на ДНК, както и статистически методи за анализ на резултатите, която сама по себе си се явява новаторски подход.

✓ **Получаване и доказване на нови факти.**

Както вече имах възможността да спомена неколкократно, предложения ми за рецензиране дисертационен труд се явява едно цялостно и завършено научно изследване, при което получените данни в огромната си част са нови и оригинални. Те са ясно изброени във добре формулираните изводи, които ще се въздържа да изброявам отново.

✓ **Получаване на потвърдителни факти**

Дисертантката при своите изследвания разширява значително единственото предхождащо подобно изследване на Наусоск, като тя потвърждава част от направените от този автор изводи, но по обем работата по дисертацията е значително по-обширна откъм използвана методология, както и откъм експериментални цели. Същевременно нейните експериментални данни потвърждават и някои отдавна изказани и от други автори хипотези за тератогенния ефект на алкохола, основаващи се единствено на наблюдения и статистически анализ на тези наблюдения, обяснявайки ги чрез изясняването на някои молекулни механизми на епигенетичен импринтинг.

7. Каква е конкретно значимостта на приносите за науката и практиката.

Неблагоприятното тератогенно влияние на алкохола е отдавна известен факт, но е странно и необяснимо, че изследванията върху един от аспектите на това неблагоприятно въздействие, а именно чрез епигенетични механизми, са изключително оскъдни. В тази светлина подбирането на изключително удачната постановка, основаваща се на добре изследвания диференциално импринтиран локус *Igf2/H19* в бластоцисти, ембриони и плаценти при мишки чрез третиране *in vivo* и *in vitro*, съчетано с изследване на експресията на някои ДНК-метилтрансферази, дава ясен модел, данните от който биха могли да бъдат екстраполирани и върху други диференциално импринтирани гени и най-вече при човек. От чисто практически аспект чрез работата си докторантката доказва по недвусмислен начин отдавна известната връзка между злоупотребата с алкохолни напитки и проблеми по време на ембрионалното и по-нататъшно развитие при човек, като основното достойнство се крие в това, че тя изяснява някои от молекулярните механизми, чрез които тази връзка се проявява.

8. До каква степен приносите в дисертационния труд са личен принос на дисертанта.

По време на изработката на дисертационния си труд, докторантката работи основно в Лабораторията по геномна динамика и стабилност в ИФРГ-БАН под научната ръководство на доц. д-р Леонид Пенков, като същевременно тя е била и на две специализации в

Обединеното кралство. По мое мнение обаче, като изключим научния ѝ ръководител, ролята на изследователските екипи, в които е работила, се изразява основно в овладяването на експериментални техники и умения работа със специализирана научна литература. За мен няма съмнение, че въпреки че днес правенето на индивидуална наука на високо ниво не е възможно, то изследователската работа е извършена основно и главно от докторантката под напътствията и със съдействието на научния ѝ ръководител.

9. Преценка на публикациите на дисертационния труд: брой; характер на изданията (международни, национални, ведомствени, служебни бюлетини), в които са отпечатани. Какво е отражението им в науката - използване и цитиране от други автори?

Дисертантката е представила към дисертацията си за разглеждане две статии, едната от които е в национално издание с импакт фактор съгласно Томпсън-Ройтерс, който за годината на публикуване 2015 г. възлиза на 0.233. Втората публикация е във ведомственото издание на ИФРГ – Journal of Plant Physiology and Genetics, което е без импакт фактор, но е индексирано в някои от международните бази данни. Към момента не се забелязват цитирания, вероятно поради относително късия период след отпечатването им. Необяснима за мен остава липсата на списък с изяви в научни форуми, каквито подозирам, че са налице. Като цяло представените публикации отговарят на изискванията на ИФРГ-БАН за допускане до защита на дисертационен труд.

10. Мотивирани препоръки за бъдещо използване на научните и научно-приложните приноси.

Въпреки че експерименталната работа по дисертационния труд представлява едно цялостно и завършено научно изследване, то създадените в процеса на изработката му експериментална постановка и схема би било да бъдат използвани, както при други импринтирани локуси, така и евентуално за влиянието на други вещества с неизяснен тератогенен ефект, използвайки същата постановка, основаваща се на метилационния статус и експресията на Igf2/H19 в миши бластоцисти, ембриони и плаценти, предвид на създадения потенциал от овладени експериментални техники и съвременни методи.

11. Авторефератът изготвен ли е съгласно изискванията, правилно ли отразява основните положения и научните приноси на дисертационния труд?

Отговаря напълно. Авторефератът е развит в рамките на 42 страници, като е оформен по стандартен начин, отразяващ накратко структурата и съдържанието на дисертационния труд (без раздела „Литературен обзор“). Разделите „Цел и задачи“ и „Изводи и приноси“ са представени идентично с тези от дисертационния труд, докато „Материали и методи“, „Резултати“ и „Обсъждане“ са представени в съкратен вид съгласно изискванията.

12. Други въпроси, по които рецензентът счита, че следва да се вземе отношение.

Много добро впечатление прави липсата на чуждици, когато терминологията има общоприет превод на български език, както и почти пълната липса на граматически и правописни грешки. Като технически забележки, които обаче не омаловажават високото качество на дисертационния труд мога да посоча разминаването на текста под някои от фигурите, при които той е отишъл на следващата страница. Изказвам и своето задоволство от това, че докторантката се е съобразила със забележките, които бяха направени на заседанието за насочване към процедура за защита, което само е допринесло за повишаване на качеството на работата като цяло.

13. Заключение с ясно становище да се даде или не научната степен.

Въпреки поставените от мен забележки, още веднъж ще изразя мнението си, че представената ми за разглеждане работа представлява едно завършено и цялостно научно изследване на високо научно ниво, поради което препоръчвам с дълбоко вътрешно убеждение на колегите от комисията да гласуват положително за присъждането на Теодора Тасева на образователната и научна степен „доктор“.

София, 03.01.2017 г.

Подпис:

/доц. д-р Светослав Димов/