

РЕЦЕНЗИЯ

ВЪРХУ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНАТА СТЕПЕН „ДОКТОР“ ПО ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3 „БИОЛОГИЧНИ НАУКИ“, НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ 01.06.06 „ГЕНЕТИКА“

АВТОР НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: Теодора Кирилова Тасева, специалист-биолог в Институт по физиология на растенията и генетика (ИФРГ) - Българска академия на науките (БАН)

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 Валя Николова Василева, лаборатория „Регулация на генната експресия“, ИФРГ-БАН

Рецензията е изготвена съгласно решение от 06.12.2016 г. на Научното жури, формирано със заповед № 1083/22.11.2016 г. на Директора на ИФРГ-БАН.

1. ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД – ОБЕМ И СТРУКТУРА

Представеният дисертационен труд е структуриран съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав на РБългария. Обемът е 174 страници, които обхващат следните раздели: увод (2 стр.), литературен обзор (37 стр.), цели и задачи (2 стр.), материали и методи (22 стр.), резултати (36 стр.), обсъждане (38 стр.), изводи и приноси (2 стр.), и цитирана литература (21 стр.). Основните раздели са логично структурирани на съответни подраздели.

Уводът към дисертационния труд въвежда в съществуващия световен проблем с използване на пристрастяващи вещества, както и обосновава интереса към алкохола като класически тератоген. Обосновката засяга и патологиите, до които може да доведе неговото използване по време на бременност, и необходимостта от задълбочени изследвания по проблема.

Литературният обзор предоставя много добър и сериозен преглед на проучванията и постиженията по изследвания научен проблем през предходните години. За изготвянето му са използвани впечатляващите 376 литературни източника и 3 линка, имащи отношение към разработваната тема. Включените шест фигури допълнително онагледяват и улесняват възприемането на представената информация. Добро впечатление прави и периодизацията на изследванията по проблема – освен отразяването на публикации от последните десет години, съответно място са намерили и публикации от по-ранен период, които представят началните изследвания по темата. Обхванати са както проучванията на учени в световен мащаб, така и предходни изследвания на колеги от ИФРГ.

Докторантката е демонстрирала отлично познаване на специализираната научна информация чрез доброто структуриране на отделните подраздели на литературния обзор. Първоначално представя алкохола като тератоген и индуктор на деформации по време на ембрионалното развитие, известни като фетален алкохолен синдром (ФАС), както и алкохол-свързаните вродени дефекти (ARBDs) и нарушенията в развитието на нервната (ARND) система, обобщени с термина

фетален алкохолен спектър от разстройства (ФАСР). След това въвежда типовете епигенетични модификации, ДНК модифициращите ензими и въздействието на алкохола върху тези модификации. В последната част на обзора представя понятието геномен импринтинг и групата на импринтираните гени, акцентирайки върху локус *Igf2/H19*, както и промените в епигенетичния статус през ембрионалното развитие.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд е формулирана точно и конкретно, и обхваща два основни аспекта – изследване на взаимовръзката между индуцираните от етанол промени по време на предимплатационния период и състоянието на импринтирания локус *Igf2/H19*, модулирано от нивото на метилиране. Поставените за решаване пет конкретни научноизследователски задачи напълно отговарят на формулираната цел и са достатъчни за постигането ѝ.

Материали и методи. Докторантката представя много подробно използваните материали и техники, което позволява ясно разбиране на същността на извършените експерименти. Включени са 6 фигури и 6 таблици, които допълнително илюстрират и улесняват разбирането на приложените методологии. Използването на конкретната моделна система (инбредна линия лабораторни мишки) и експериментална схема са добре мотивирани, което е съчетано с отлично описание на методите за получаване и третиране на бластоцисти, ембриони и плаценти, както и постановката на *in vitro* и *in vivo* експериментите. Прилагани са широк спектър от съвременни молекулярно биологични, генетични и епигенетични техники, като изолиране на ДНК и РНК, обратна транскрипция на РНК, анализи на генната експресия чрез RT-PCR, използване на специализирани софтуерни програми и др. Като особен принос на докторантката може да се изтъкне адаптирането и въвеждането в ИФРГ на метод за анализ на метилационния статус на ДНК чрез MS-HRM (Methylation-sensitive high-resolution melting). Направени са впечатляващи статистически анализи на резултатите, като са обсъдени положителните и отрицателните страни на отделните компоненти в тези анализи. Критичният и аналитичен подход към приложените техники показва отличното им владение от докторантката и позволява тяхното бъдещо възпроизвеждане от други учени.

Раздел **Резултати** подробно описва извършените анализи, представяйки получените данни в логическа последователност. Първоначално са описани резултатите от оптимизирането на средата за *in vitro* култивиране и ефектите на етанола върху развитието на бластоцисти, ембриони и плаценти. След това са представени анализите на нивата на експресия на проучените гени и локуси след третиране с етанол, и анализите на метилационния статус на изследвания импринтиран локус. В края на раздела е описана извършената обстойна статистическа обработка на данните, включваща корелационни зависимости и използване на софтуера SPSS за установяване на индиректен ефект. Получените резултати напълно покриват изпълнението на поставените

експериментални задачи, като в крайна сметка се постигат и поставените цели. Резултатите са отлично онагледени с 42 фигури и 4 таблици.

В раздел **Обсъждане** получените резултати са подложени на задълбочена и критична дискусия, основана на съпоставката им с данните на други изследователи по тематиката. Обемът на този раздел превишава останалите части на дисертационния труд, което е малко необичайно, но според мен, напълно оправдано. В началото на раздела се дава обосновка на поставените цели и формулираната работна хипотеза, след което се представят и дискутират най-важните резултати в съответни подраздели. Структурирането на подразделите следва логиката на изследванията, като се акцентира върху основните моменти на извършената работа. В края на всеки подраздел се прави съпоставка на собствени резултати с публикуваните до момента литературни данни, като се уточнява техния новаторски или потвърдителен характер.

Този раздел ясно показва способността на докторантката да систематизира и осмисля критично съществуващата научна литература, както и да заема аргументирана позиция. Направените дискусии и обобщения демонстрират нейната добра професионална подготовка и задълбочените познания по разработвания проблем.

Изводи и приноси. Изводите от дисертационния труд са 8 на брой и са в пълно съответствие с получените резултати. Докторантът посочва и 6 приноса с оригинален характер, които обобщават научната значимост на изследването и които приемам напълно.

2. АКТУАЛНОСТ НА РАЗРАБОТЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ПРОБЛЕМ В НАУЧНО И НАУЧНО-ПРИЛОЖНО ОТНОШЕНИЕ

Разработваният проблем е изключително актуален, тъй като разглежда въпроси, свързани с проучване на алкохолната тератогенеза, предизвикана от епигенетично репрограмиране на генома. За експерименталната работа е използвана инbredна линия лабораторни мишки, която има широко приложение като модел за проучване на заболявания при човека. Получените резултати за концентрационно-зависимия ефект на етанола върху ембрионалното развитие на мишки и нивата на експресия и метилиране на импринтиран локус *Igf2/H19* имат съществен принос към по-доброто разбиране на ФАСР, което дава нови възможности за профилактика, диагностика и терапия при човека. Поради това, че в Европейския съюз консумирането на алкохол е най-сериозно, проучванията по тази тематика трябва да бъдат насърчавани и разширявани, което ще осигури допълнителни познания за механизмите на специфичните алкохол-индуцирани патологии и различната им степен на проява.

3. ПОЗНАВА ЛИ ДИСЕРТАНТЪТ СЪСТОЯНИЕТО НА ПРОБЛЕМА И ОЦЕНЯВА ЛИ ТВОРЧЕСКИ ЛИТЕРАТУРНИЯ МАТЕРИАЛ?

Докторантката работи в изследваната област от години и очевидно познава задълбочено проблематиката на дисертационния труд, което се доказва от следните факти. От една страна, цитираните 376 литературни източника илюстрират нейната отличната информираност по темата,

от друга – тази литература е използвана за компетентно и критично дискутиране на получените резултати. Обемът на раздел „Обсъждане“ е съпоставим с този на „Резултати“ и дори го превишава, което показва, че докторантката не само е запозната със съвременното състояние на изследвания проблем, но проявява аналитично отношение, като интерпретира и съпоставя собствените си резултати с тези, получени от други изследователи.

4. ИЗБРАНТЕ МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ МОГАТ ЛИ ДА ДАДАТ ОТГОВОР НА ПОСТАВЕНИТЕ ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД?

Както беше споменато по-горе, методическите подходи са напълно подходящи за реализиране на целите на настоящия труд и дават добра гаранция за успешното решение на поставените задачи. Въведен е иновативен експериментален подход, свързан с получаване и третиране на ембриони, бластоцисти и плаценти, оценка на експресията и метилационния статус на ДНК, както и компетентно провеждане на статистически анализ. Всички тези съвременни методи и техники са предпоставка за убедителност и надеждност на получените резултати, и постигане на поставените цели и задачи в дисертационния труд.

5. КРАТКА АНАЛИТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕСТЕСТВОТО И ДОСТОВЕРНОСТТА НА МАТЕРИАЛА, ВЪРХУ КОЙТО СЕ ГРАДЯТ ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цялостното съдържание на дисертационния труд, включващо изчерпателен литературен обзор, добре представени резултати и методически процедури, както и творчески анализ на данните, дават добра гаранция за достоверността на материала. От своя страна, получените значими резултати удостоверяват правилността на методическия подход и добрата постановка на експериментите. Като цяло, рецензираният дисертационен труд е едно комплексно, задълбочено и аналитично изследване в областта на генетиката, което има важни научни приноси за разбирането на ефектите на етанола по време на предимплационния етап на бременност при мишки. Изследването е и иновативно по характер, тъй като в световната научна литература липсват подобни многостранни разработки с използване на съвременни техники, което още веднъж потвърждава оригиналността и достоверността на материала.

6. В КАКВО СЕ ЗАКЛЮЧАВАТ НАУЧНИТЕ ИЛИ НАУЧНО-ПРИЛОЖНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД?

Получените оригинални резултати са коректно отразени във формулираните приноси на дисертационния труд, които могат да бъдат разделени на фундаментални и приложни. С *фундаментален характер* са приносите, свързани с етанол-индуцираната промяна в експресията на *Igf2* и стимулиращият ѝ ефект върху растежа на бластоцитите, както и с установената аберантна експресия на изследваните метилтрансферази в плаценти със забавен растеж. Друг фундаментален принос е доказаната тъканна и гена специфичност на ефектите на етанола в началото на имплантацията, изразяващи се в модифициран метилационен статус и експресия на локус *Igf2/H19*. Към *научно-приложните приноси* може да се отнесе разработената оптимизирана среда на

култивиране, осигуряваща развитие на ембриони в *in vitro* условия до нива на развитие, наподобяващи тези при *in vivo* условия. Установената липса на резистентност към етанол на референтните гени *Gapdh* и *ActB* също може да се причисли към научно-приложните приноси, тъй като доказва, че тези гени не са подходящи за ендogenous стандарти, а в същото време се въвеждат други референтни гени (*Atp5b* и *Hsp90ab*) със стабилна експресия след въздействие с етанол. В допълнение, предложен е нов методически подход, който се основава на оценката на експресията, съчетана с анализ на нивата на метилиране чрез метилационно-специфичен HRM след третиране с етанол в *in vivo* и *in vitro* условия. Този подход е уникален и иновативен, и също може да бъде разгледан като приложен принос, тъй като предоставя експериментална постановка за изследване на други вещества с тератогенен ефект, както и за изследването на други импринтирани гени/локуси.

7. КАКВА Е КОНКРЕТНО ЗНАЧИМОСТТА НА ПРИНОСИТЕ ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА?

Представената дисертационна разработка засяга изключително актуален и социално значим проблем, а получената информация може да намери приложение в медицината. Направен е много обстоен анализ на ефекта на етанола върху епигенетичния статус и експресията на импринтирания locus *Igf2/H19* в предимплантационния период и връзката на този ефект с намаленото тегло на ембриони и плаценти в средата на бременността при мишки. Резултатите, получени при използването на мишки като моделен обект, могат лесно да бъдат приложени при човек. Тези данни имат съществен научен принос, тъй като доказват силната чувствителност на краткия период на ембриогенезата към тератогенни фактори, оспорвайки доскорошната представа за липсата на чувствителност към тератогенно въздействие. Изследването на фундаменталните епигенетични механизми, засягащи развитието на организмите и тяхната чувствителност към промени, са от изключителна важност, тъй като някои епигенетични промени, индуцирани от изменящите се условия, могат да се унаследяват. Както беше вече споменато, проучването на алкохола като тератоген, освен разбиране на етиологията на ФАС, има важна приложна значимост за профилактиката, диагностиката и терапията на синдрома.

8. ДО КАКВА СТЕПЕН ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД СА ЛИЧЕН ПРИНОС НА ДИСЕРТАНТА?

В представените две научни публикации в съавторство, докторантката е първи и кореспондиращ автор, което несъмнено показва водещата ѝ роля в научноизследователската работа и публикуването на резултатите. Имам и лични впечатления от хода на експерименталната дейност и упоритата работа по дисертационния труд, които също са в подкрепа на неоспоримия принос на докторантката за получените резултати и приноси. На проведената предзащита докторантката убедително отговори на всички зададени въпроси, и дискутира и интерпретира представените резултати, което е още едно доказателство за отличната ѝ осведоменост и личния принос в представената разработка.

9. ПРЕЦЕНКА НА ПУБЛИКАЦИИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД. КАКВО Е ОТРАЖЕНИЕТО ИМ В НАУКАТА - ИЗПОЛЗВАНЕ И ЦИТИРАНЕ ОТ ДРУГИ АВТОРИ?

Представени са две публикувани статии по темата на дисертацията. Първата публикация е в *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, национално издание с импакт фактор 0.233, а втората е в изданието на ИФРГ - *Genetics and Plant Physiology*, което е без импакт фактор, но се реферира в Google Scholar и други бази данни. Тези публикации отговарят на изискванията на ИФРГ-БАН за допускане до защита на дисертационен труд. Цитирания на представените статии все още не са забелязани. Предвид актуалността на тематиката, получените интересни резултати и липсата на информация по разработената тема в световен мащаб, ще си позволя да препоръчам в кратък срок да бъдат подготвени допълнителни публикации за международни реферирани издания.

10. МОТИВИРАНИ ПРЕПОРЪКИ ЗА БЪДЕЩО ИЗПОЛЗВАНЕ НА НАУЧНИТЕ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИТЕ ПРИНОСИ

Дисертационният труд полага началото на едно изключително важно изследване, което може да бъде използвано като основа за по-нататъшни разработки на докторантката във формат постдокторска специализация. Предвид актуалността на тематиката и все по-широкия интерес към ролята на епигенетичните фактори за редица заболявания при човека, иницирането на съвместни проекти с водещи световни учени и лаборатории също би могло да допринесе за продължаването на изследванията по темата. Правилните стъпки в тази посока докторантката е предприела още при работата си върху дисертационния труд с осъществяването на две краткосрочни специализации във Великобритания в лабораториите на проф. Жозефин Петерс (Mammalian Genetics Unit, Medical Research Council, Harwell, Oxfordshire) и проф. Анне Фергюсън-Смит (Департамент по генетика, Университет в Кеймбридж). Приносите за етанол-индуцираната атипична експресия на изследваните *de novo* и поддържащи метилтрансферази дават перспектива за продължаване на изследванията в посока търсене на взаимовръзка с експресията на други прицелни гени и/или генни локуси. В подобна насока могат да бъдат разработвани и данните за зависимостта от дозата активиращо или инхибиращо действие на етанола върху ембрионалното развитие. Тези изследвания ще допринесат за разкриване на по-цялостна картина за сложната мрежа от взаимодействия на генетично и епигенетично ниво, и връзката им с ендогенни и екзогенни фактори.

11. АВТОРЕФЕРАТЪТ ИЗГОТВЕН ЛИ Е СЪГЛАСНО ИЗИСКВАНИЯТА, ПРАВИЛНО ЛИ ОТРАЗЯВА ОСНОВНИТЕ ПОЛОЖЕНИЯ И НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД?

Авторефератът е изготвен съобразно изискванията и отразява точно всички основни експериментални резултати и теоретични интерпретации от дисертационния труд. Структурирането и обемът от 42 страници също отговарят на стандартите. В края на автореферата е приложен и списък на публикациите, свързани с дисертационната разработка.

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

Дисертационният труд е впечатляващ както със сложните и трудоемки експериментални процедури, така и с актуалността на използваните иновативни подходи. Докторантката е демонстрирала висока компетентност в специфичната тематична област и отлични умения да прилага разнообразни научноизследователски подходи за постигане на поставените цели и задачи, както и коректно да обработва и интерпретира получените резултати. Научните приноси дават перспектива за по-нататъшно развитие на изследванията както във фундаментален, така и в приложен аспект. Добро впечатление прави и умението на докторантката да поднася научна информация на ясен и разбираем език, което прави дисертационния труд достъпно четиво и за неспециалисти. На базата на гореизложеното считам, че образователните и научни цели на докторантурата са изпълнени успешно, и докторантката е подготвена да провежда самостоятелна научноизследователска дейност, както и да работи в научен екип.

Към докторантката имам следните въпроси: 1. Смята ли, че за постигане на целите на изследването е достатъчна оценката на експресионните нива само на две ДНК метилтрансферази – *Dnmt1* и *Dnmt3a*? 2. Докторантката споменава в литературния обзор за поддържаща функция на *de novo* метилтрансферазите *Dnmt3a* и *Dnmt3b*. Известна ли ѝ е информация за включване на *Dnmt1* в *de novo* метилирането, каквато съществува за растителния ортолог *MET1* ?

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

Представеният дисертационен труд отразява актуален проблем, във връзка с който е извършена огромна експериментална и проучвателна дейност, довела до съществени научноизследователски резултати и приноси. Извършената работа, както и представените публикации по дисертационния труд, напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИФРГ-БАН. Като член на Научното жури убедено ще гласувам положително и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури също да подкрепят присъждането на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3 „Биологични науки”, научна специалност 01.06.06 „Генетика” на Теодора Кирилова Тасева.

София, 02.02.2017 г.

Подпис:

(доц. д-р Валя Василева)