

РЕЦЕНЗИЯ

от акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн

на дисертационния труд на Светлана Иванова Иванова „Клетъчен биосензор за оценка на повърхностна биосъвместимост”, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: „Клетъчна биология“

1. Обща част

Светлана Иванова Иванова е докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Цитология, хистология и ембриология” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”. Нейният дисертационен труд озаглавен: „Клетъчен биосензор за оценка на повърхностна биосъвместимост” е представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: „Клетъчна биология“. Той е изработен под научното ръководство на чл.-кор. проф. дбн Румен Панков и доц. д-р Стоян Чакърров от същия факултет и обхваща 132 страници, 34 фигури, 5 таблици и 239 литературни източници.

2. Кратки биографични данни

Светлана Иванова Иванова е родена на 28.02.1978 г. Тя е възпитаник на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, откъдето през 2002 г. придобива ОКС „Бакалавър“ по специалността „Биотехнологии“, а през 2004 г. ОКС „Магистър“ - специалност „Генно и клетъчно инженерство“. От 2016 г. е докторант на самостоятелна подготовка при Катедра „Цитология, хистология и ембриология“. След завършване на висшето си образование Светлана Иванова е работила като биотехнолог в Научно технологично обслужване ООД, а от 2015 година е продуктов специалист в Ридакон ЕООД. До този момент тя е публикувала 2 научни статии и 3 резюмета от научни доклади, от които 4 са свързани с нейната дисертация. Участвала е в разработването на 4 научно-изследователски проекти.

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на Светлана Иванова е посветен на разработването на клетъчен биосензор за оценка на биосъвместимостта на нови биомиметични материали предназначени за нуждите на регенеративната медицина. Тъй като прилаганите понастоящем критерии за оценка на качествата на новите материали не се различават съществено от тези за допустимост на нови лекарствени средства (токсичност, цитотоксичност, генотоксичност, сенсибилизация, дразнене, карциногенно действие и др.), докторантката счита, че за тях е необходима и допълнителна биологична оценка отнасяща се до потенциала им да поддържат процесите на клетъчната адхезия, пролиферацията и диференциацията, и по този начин да стимулират цялостна тъканна регенерация. Имайки предвид, че регенеративната медицина и имплантологията са едни от най-перспективните и бързо развиващи се области на медицината, то актуалността на разработваната тема не буди никакво съмнение.

4. Познаване на проблема

Докторантката е добре запозната с литературата свързана с разработвания от нея научен проблем. Литературният обзор обхваща около 35 страници и включва три раздела, от които първият е посветен на *взаимодействието на клетката с външната среда*, вторият - на принципите на *тъканно инженерство и регенеративна медицина*, а третият - на *биосензорите базирани на живи клетки*. Впечатляващ е първият раздел на обзора, в

който Иванова задълбочено и аналитично разглежда основните белтъци участващи в клетъчно-адхезивните контакти (интегрини, актин, талин, винкулин, паксилон и тенсин); видовете клетъчни адхезии и техните характеристики (фокални комплекси, фокални адхезии, фибрилари адхезии, подозоми, адхезивни контакти на триизмерния матрикс, динамика на адхезивните контакти и др.), състава и структурата на извънклетъчния матрикс (фибронектин, колаген, ламинин и витронектин).

Вторият раздел на обзора дава представа за принципите и проблемите на тъканно инженерство и регенеративна медицина. От него става ясно, че това е бързо развиваща се интердисциплинарна област, която изисква задълбочени знания по клетъчна биология, хистология, биохимия, биофизика и др. Въпреки големите успехи в тази област, докторатката установява, че представата за биосъвместимост на новите материали днес все още се отнася до тяхната безвредност, но не и до функционалната им надеждност и дълготрайност, което налага преоценка на въпроса за взаимодействието им с живите тъкани и системи.

От последния раздел на става ясно, че още по-комплексни знания са необходими при разработването на биосензори - най-чувствителните и специфични измервателни прибори в съвременната аналитична практика. От трите вида биосензори (молекулни, клетъчни и тъканни), за оценка на биосъвместимостта на нови биомиметични материали докторантката избира такъв базиран на еукариотни клетки и в частност на утвърдената фибробластна линия NIH/3T3.

След задълбочения анализ на литературните данни, С. Иванова успешно намира своята изследователска ниша и формулира точно и ясно целите и задачите на своята дисертация, а именно, *да създаде клетъчен биосензор за количествено определяне на клетъчно-адхезивните контакти, въз основа на които да прави оценка за биосъвместимост на материали предназначени за нуждите на регенеративната медицина.* За постигането на тази цел са формулирани шест задачи, които намирам за целесъобразни и адекватни на поставената цел.

5. Методика на изследването

Както може да се очаква, интердисциплинарната разработка изисква разнообразна методология присъща на науки от различни области. Ето защо методичният раздел също избоблява от разнообразни аналитични и препаративни методи – биохимични, молекулярно-биологични, клетъчно-биологични, имунологични, биофизични, статистически и др. Методите са описани много подробно, което позволява експериментите да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература, а това прави дисертационния труд ценно методично пособие в ръцете на други студенти и докторанти специализиращи в областта на клетъчната биология. Още от методичния раздел мога да направя заключението, че докторантката е добре подготвен експериментатор, с което е постигнала една от целите на своята докторантура.

6. Оценка на получените резултати

Резултатите от изследванията свързани с дисертацията на С. Иванова са представени и дискутирани на около 50 страници в раздел „Резултати и дискусия“. Изхождайки от обстоятелството, че имплантацията на биомиметичните материали задължително въвлича клетките на съседните тъкани във взаимодействие с импланта, където водеща е адхезията, докторантката основателно се насочва към изучаване на клетъчната адхезия като индикатор за биосъвместимост. Тя правилно приема, че морфологичните характеристики и площта на адхезивните контакти биха могли да служат като критерии за оценка на повърхностните свойства, а оттам и на биосъвместимостта на материалите, но от практическа гледна точка микроскопският контрол не е много удобен. Биосензорът трябва

да регистрира бързо и точно измерими химически или физически сигнали и да бъде стабилен до времетраенето на експеримента.

Както вече беше отбелязано, за изграждането на биосензор докторантката избира утвърдената фибробластна клетъчна линия NIH/3T3. Тя е добре проучена, лесно се отглежда при стандартни условия и формира както фокални (FA) така и фибриларни интегринови адхезии (FbA). Фактът, че при образуването на адхезии фибробластите предпочитат взаимодействието с компонентите на екстрацелуларния матрикс (ECM) пък позволява експресията на тези молекули да бъде използвана за количествена оценка на самите адхезии. От многобройните белтъци участващи в изграждането на адхезивните контакти, за проследяване на фокалните адхезии докторантката избира винкулин (VCL), паксиллин (PXN) и тенсин (TNS). Но понеже от тях само тенсинът се локализира във FbA, той може да служи като биомаркер за разпознаване на двата типа адхезии. За тази цел трите протеина са белязани флуоресцентно чрез сливане с протеините mCherry и EGFP. Те флуоресцират съответно при дължини на възбуждане 587 nm и 488 nm и дължини на емисия 610 nm и 509 nm. Гените на хибридните белтъци, обозначени като mCherry-Vinculin, mCherry-Paxillin и RKGFP-Tensin са трансфектирани в различни комбинации във фибробластните клетки, които впоследствие са култивирани и скринирани за наличие на стабилни трансформанти. Всъщност работните комбинации от флуоресцентно белязани хибридни молекули са винкулин-тенсин и паксиллин-тенсин, като едновременното присъствие и на трите (винкулин, паксиллин и тенсин) е индикация за FA, а само на тенсин - за FbA. За оценка на адхезивните контакти като субстрати са използвани някои от главните компоненти на ECM, като фибронектин (Fn), витронектин (Vn), ламинин-111 (Ln-111), ламинин-521 (Ln-521) и колаген тип I (CnI).

Във връзка със създаването на клетъчния биосензор е извършена огромна по обем работа, илюстрация за която са хилядите спектроскопски измервания, микроскопски наблюдения и имунохимични анализи проведени с цел подбор на подходящ стабилен фибробластен клон. За целта докторантката е анализирала 1 224 микроскопски препарата на първични трансформанти и е идентифицирала 185 клона, от които 122 експресират mCherry-винкулин и GFP-тенсин и 38 клона - mCherry-паксиллин и GFP-тенсин. След верификация на експресията на хибридните белтъци посредством имунохимична реакция (Western имуоблот), денситометричен анализ, определяне за нивата на експресия на хибридните белтъци и др., е избран устойчивият на G418 и пурамицин клон VT1.9, експресиращ хибридните белтъци mCherry-винкулин и GFP-тенсин в оптимално високи концентрации. Той е тестван спрямо пет естествени субстрата (фибронектин, витронектин, ламинин-111, ламинин-521 и колаген тип I) където е показал възпроизводими и съпоставими резултати по отношение на адхезивния потенциал. Това е дало основание на докторантката да го препоръча за изследване и сравнение на адхезивните свойства и на други материали. Засега новият биосензор е тестван върху PDMS базираните кополимери поли-(диметокси- β -акрилова киселина) и поли-(диметоксилоксан- β -акрилова киселина), където е установено, че първият има значително по-добра повърхностна биосъвместимост. Достоинство на биосензора VT1.9 е, че той е чувствителен и към еластичността на изследваните субстрати.

Резултатите от изследванията са богато илюстрирани с цветни фигури, таблици и схеми и са дискутирани задълбочено в светлината на използваните литературни източници.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Изследванията свързани с дисертацията на С. Иванова имат подчертан научно-приложен характер. Проведени са задълбочени фундаментални проучвания върху авторски конструирания биосензор VT1.9, който е базиран на трансформирани човешки фибробласти, стабилно експресиращи флуоресцентно белязаните протеини винкулин,

паксиллин и тенсин. Биосензорът е тестван върху редица естествени клетъчни субстрати и е апобиран върху два синтетични полимера (виж по-горе). Това е първият клетъчен биосензор за оценка на биосъвместимостта на нови материали за регенеративната медицина основан на измерването на обективни параметри на клетъчните фокални и фибрилари адхезии.

8. Публикации

Резултатите от изследванията на С. Иванова са отразени в 2 научни статии в списания с ИФ (общ ИФ 4.415) в които тя е водещ автор. Те са докладвани и на 2 национални научни форума. За един от трудовете публикуван през 2017 г. вече е забелязан 1 цитат.

9. Автореферат, изводи приноси

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията. Направените изводи и приноси са обективни и съответстват на получените резултати.

10. Критични бележки и препоръки

Дисертационният труд е написан с вещина на точен и ясен научен език и към него нямам забележки по същество. В дисертацията и автореферата се срещат чуждици и думи от лабораторния жаргон, които приемам като допустими за такива интердисциплинарни трудове на български език.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Светлана Иванова е пример за комплексно научно изследване в областта на клетъчната биология и в частност на клетъчната адхезия. Трудът е интердисциплинарен и при неговата реализация са използвани знания и умения от различни области на природните науки. Приложена е модерна методология и експериментална техника, с помощта на която са получени значими научни резултати, отразени в 2 научни статии в списания с общ ИФ 4.415 и 2 научни доклада. В резултат на проведените изследвания е създаден уникален биосензор (VT1.9) за количествена оценка на клетъчната адхезия като мярка за определяне на биосъвместимостта на нови биомиметични материали предназначени за нуждите на регенеративната медицина. Със своите научни постижения, умения и научна продукция докторантът се представя като изграден изследовател в областта на клетъчната биология, който удовлетворява напълно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на СУ „Св. Кл. Охридски“ и БФ при СУ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“. Това ми дава основание убедено да препоръчам на Научното жури определено да проведе защитата на дисертационния труд на С. Иванова *да ѝ я присъди*.

19.12.2017 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/