

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд “Сигнализация при клетки, отглеждани в условия на триизмерен матрикс”

на Ралица Бориславова Скробанска,

представен за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

Рецензент: професор Бойка Аначкова, д.б.н.

от Институт по молекулярна биология - БАН

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на Ралица Скробанска, изработен в катедра “Цитология, хистология и ембриология” на БФ на СУ “Климент Охридски” е по специалността клетъчна биология. Предмет на изследването са сигналните пътища, регулиращи пролиферацията на клетките. Тъй като все още не съществуват утвърдени моделни системи за изследване на сигнализацията в *in vivo*-подобни условия, основната цел на дисертацията е създаване и характеризиране на нова триизмерна система за клетъчно култивиране с висока приближеност до здрава тъкан. Целта на дисертацията може да се определи като амбициозна, в една модерна област на клетъчната биология, важна както във фундаментално, така и в практическо отношение поради значението на регулацията на пролиферацията за развитието на неопластичните заболявания.

Дисертационният труд е написан според класическата схема. Той съдържа 135 машинописни страници и е богато илюстриран с 13 схеми и 1 таблица представени в Литературния обзор и 42 фигури в представени в раздел Резултати. Библиографията включва 223 източника.

Литературният обзор е целенасочен, балансиран и добре написан. Той показва, че докторантката е с висока клетъчно-биологична култура, много добре запозната с литературата по върховете, върху които работи. В обзора обстойно са разгледани следните регулаторни пътища: каскадата Ras-Raf-MEK-ERK1/2, която е един от основните сигнални пътища, отговорен за предаването до

клетката на извънклетъчните сигнали с отношение към регулирането на клетъчния цикъл и фамилията от протеин тирозинови кинази FAK и Src, които свързват интегриновите рецептори с активирането на ERK1/2 киназите. Накратко е представена литературата по синтеза на холестерол и ролята на мембранныя холестерол за регулацията на клетъчната сигнализация, кавеолинът като компонент на мембранните домени рафтове и кавеоли и ролята му в локализацията на ERK1/2 в клетките, статини и техните холестерол-независими ефекти и апоптоза. Обзорът завършва с представяне на характеристиките на съществуващите до момента тъканно-подобни триизмерни моделни системи за клетъчно култивиране. Забележката ми към тази част от дисертацията е, че има печатни грешки, като комичната геннии вместо гени, например.

Целите и задачите на дисертационния труд са поставени ясно и точно.

От прегледа на изложените в раздела Материали и методи експериментални техники, може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантката се е изградила като високо-квалифициран клетъчен биолог. Усвоени са много широк кръг от модерни методи, като сложни процедури за култивиране на клетки и анализ на тяхната виталност и пролиферация, FACS анализ, имуноблотинг анализ с голям набор от антитела, имуноцитохимични и имунохистохимични методи, биофизични и биохимични методи за анализ на мембрани и техни компоненти. Използваните методи са подробно описани и приложените методи са адекватни за изпълнение на поставените цели и задачи.

От прочита на раздел Резултати и обсъждане се вижда, че е извършена значителна по обем работа. Експериментите са интелигентно замислени, а заключенията са защитени с необходимите контроли и повторения с независими методи. Накратко, получените резултати могат да бъдат обобщени по следния начин. В първата част на раздела детайлно са изследвани морфологията, миграцията, адхезията, пролиферацията и сигнализацията в първични човешки фибробласти култивирани във въведената от научния ръководител на докторантката моделна система за култивиране на клетки в постклетъчен триизмерен (3D) матрикс. Установени са значителни различия в тези параметри в сравнение с фибробласти култивирани в конвенционални двуизмерни

субстрати. Култивирането на фибробласти в постклетъчния матрикс води до повишаване на пролиферацията на клетките и до експресията на гладкомускулен алфа-актин, а активирането на Ras-Raf- ERK1/2 сигналния път е FAK-независим, но Src-зависим процес. Получените резултати водят до заключението, че култивирането на фибробласти в постклетъчен 3D матрикс е подходяща моделна система за изследване на фибробластно активиране в резултат на нараняване в *in vivo* подобни условия, но неподходяща за изследване на неделящи се фибробласти, състояние, което е по-близко до състоянието на фибробластите в здрава ненаранена тъкан.

Във втората част на раздела Резултати са представени експериментите по въвеждането на нова моделна система за култивиране на фибробласти в нативен 3D матрикс. За целта е използвана мишата фибробластна линия GD25 β 1, която запазва способността си за нарастване след достигане на 100% конfluентност и формира многослойна култура от клетки, обгърнати от естествено синтезиран от самите клетки извънклетъчен матрикс. Популацията от клетки растяща в нативния 3D матрикс се характеризира с линейно нарастване и съответно с подтисната пролиферация, която не се дължи на стареене, апоптоза или недостиг на хранителни вещества и растежни фактори. Делящите се клетки не са обособена популация и са разпръснати равномерно в културата. Ниското ниво на пролиферацията корелира с подтисната експресия на циклин D1 в тези клетки. Това обаче не е свързано с промяна във фосфорилирането и съответно активирането на ERK1/2, FAK и Src, а е в резултат на секвестрирането на ERK в рафт домените на мембраните, които са с повишено количество на холестерол в така култивираните клетки.

В третата част от раздела Резултати е проведено експериментално манипулиране на ERK-зависимата сигнализация в триизмерни условия на култивиране чрез третиране с инхибитора на синтеза на холестерол ловастатин. При определена концентрация на ловастатина се постига релокализация на ERK1/2 в ядрото и увеличение на експресията на циклин D1. Това е потвърдено и чрез измерване на количеството на фосфорилиран ERK1/2 в мембранната фракция, съдържаща рафт домените, след прехвърляне на клетките

от 3D условия на култивиране в 2D култивиране. Резултатите показват, че фосфорилирания ERK1/2 в рафт домените намалява. Разделът Резултати и обсъждане завършва със заключение, че 3D нативната матриксна култура представлява високо приближен тъканен аналог, който дава възможност да бъдат изучавани промените в сигнализацията на съединителната тъкан при различни заболявания.

Към раздела Резултати и обсъждане имам следния въпрос към докторантката: Защо е избрана клетъчната линия GD25β1 за осъществяване на експериментите с 3D нативен извънклетъчен матрикс и ще я помоля да обясни по-подробно как е създаден тя.

Приемам формулировката на изводите на дисертационния труд и смятам, че те интерпретират правилно получените експериментални резултати.

Като цяло, дисертационният труд е написан много добре, а качеството на илюстративния материал е отлично.

Резултатите от изследванията са публикувани в 2 научни статии. Едната е публикувана в списанието Cell Biology International с импакт фактор 1.8, а другата представлява доклад в пълен текст на международна научна конференция в Стара Загора. И в двете статии Ралица Скробанска по баща Дамянова е водещ автор, което отразява нейната решаваща роля при изработването на публикациите. Забелязани са 4 броя цитати. Резултатите от дисертационния труд са били докладвани и на 2 научни конференции.

Авторефератът отразява правилно съдържанието на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Ралица Скробанска е посветен на важен и модерен научен проблем и получените резултати имат оригинален характер и представляват научен принос в изучаването на сигналните пътища, регулиращи пролиферацията на клетките. Дисертационният труд е изработен на високо технологично ниво и разкрива авторката си като високо квалифициран и компетентен клетъчен биолог. Всичко това ми дава основание убедено да

препоръчам на уважаемото Жури да присъди на Ралица Бориславова
Скробанска образователната и научна степен Доктор.

05.08.2011

София

/Бойка Аначкова/