

СТАНОВИЩЕ

от Доц. Калина Иванова Вапцарова

относно: представения за защита дисертационен труд на

Ралица Бориславова Скробанска

от Катедра „Цитология, хистология и ембриология” към Биологически факултет на

Софийски Университет „СВ Климент Охридски”

на тема:” Сигнализация при клетки, отглеждани в условия на триизмерен матрикс”

Най-голямото откритие на настоящия век- секвенирането на човешкия геном, даде изключителен тласък на биологичните изследвания върху двупосочния обмен на информация между генома и сигналите от околната среда. В процес на изясняване е наличието, състава и функцията на клетъчния инструментариум за сигнализиция, включващ основно сигнали, рецептори и вътреклетъчни сигнални пътища с отговор на генома променящ физиологичния статус на клетката. Начинът, по който вътреклетъчните сигнални каскади увеличават скоростта, ефикасността и специфичността на клетъчния отговор към съответния сигнал, е свързан с исконните въпроси на човечеството: как се осигурява морфологичния и физиологичен интегритет на сложно изградения човешки организъм, какво е естеството на адаптация и на реакция към различните патогени? Точно тази област засяга дисертационния труд на Ралица Скробанска, което определя неговата актуалност.

Целенасочено направеният обзор илюстрира съвременните схващания за “архитектурата” от подредени модули, изграждащи сигналните пътища, които пренасочват протичането на процеса така, че входящия сигнал, без да се разрежда, да достига до ефектора. Изтъкнат е основният процес на сигналните каскади-фосфорилирането, специфично за всеки белтъчен участник и определящо неговата активност. Подчертава се, че сложните и фино оркестрирани процеси на клетъчната сигнализиция са истинско предизвикателство за намиране на експериментални подходи, чийто резултати да са адекватни на процесите *in vivo*. Ралица Скробанска, приема това предизвикателство като си поставя, казано в резюме, две основни задачи: 1). създаване и характеризирание на моделна 3D системи от фибробластните линии NIH3T3 и GD25β1, със свойството да изграждат екстрацелуларен матрикс (ECM); 2). изследване свойствата и активността на сигналната каскада с участници- Src/FAK/Ras/Raf ERK1 / 2 в тези 3D системи. Изборът на посочения сигнален път е удачен поради факта, че се инициира и от интегринови рецептори, чийто агонисти са макромолекулите на екстрацелуларния матрикс, както и на ясно проявения му краен ефект с индуцирана синтеза на циклин D1 и изявена клетъчна пролиферация. Избраната експериментална постановка дава възможност за оценка и сравнение между участниците и активността им в сигналната каскада протичаща в 2D и 3D системите, както и при *in vivo* системата от фибробласти на подкожна миша тъкан. Използван е впечатляващ набор от съвременни експериментални методи, като активирания кинази, включени в сигналния път се определят по тяхното специфично фосфорилиране, детектирано със съответните антитела. В раздела резултати и обсъждане се акцентира върху описанието на резултатите, а те показват, че при твърдата с фибронектин 2D моделна система, адхезионните процеси са силно стимулирани, което активира FAK/Ras/ ERK 1 / 2 сигнализицията, индуцирана синтеза на циклин D1 и крайният ефект е силно изразената пролиферация на фибробластите. Увеличената клетъчна пролиферация, обаче отличава клетъчните култури от „спокойните” клетки наблюдавани *in vivo*. По тази причина, според дисертантката, широко използваните експерименти с 2D системите са обект на ревизия. Ралица Скробанска посочва нов подход за експериментиране като намира, че

меките и пластични 3D ситемни на ЕСМ'и, синтезирани от култивираните NIH3T3 и GD25β1 фибробласти, поставят клетите в по-физиологично състояние. В този случай максималното активиране на FAK се избягва, клетъчната сигнализация се пренасочва през Src, тя е Ras независима, а пролиферацията е редуцирана. Резултатите от експериментите определящи виталност, апоптоза, линеен профил на клетъчния разтеж и др. водят до извода, че по-удачна е 3D системата с ЕСМ синтезиран от GD25β1 фибробласти. Представени са оригинални резултати, според, които намалената клетъчна пролиферация в тази система, се дължи на транслокация на ERK 1 / 2 от цитозола в богатите на холестерол рафтове на фибробластните плазматични мембрани. Сходна характеристика на сигнализация се наблюдава при *in vivo* системата от фибробласти на подкожна миша тъкан, което подвърждава близостта на получената 3D системата с ЕСМ синтезиран от GD25β1 клетките, до протичането на клетъчната сигнализация *in vivo*. Надежността на тези резултати е потвърдена от серия контролни опити. Те показват, първо че при обратното прехвърляне на фибробластите от 3D в 2D система на култивиране, сигналният път FAK/Ras/ ERK 1 / 2 се възстановява с индуциратна синтеза на циклин D1 и усилен клетъчна пролиферация и второ, че задържането на ERK1 / 2 във плазматичните мембрани наистина се дължи на повишеното количество холестерол, тъй като неговото намаление при третиране с препарата ловастатин води до освобождаване на ензима и стимулиране на пролиферацията. Така прецизирането с контролни опити възнаграждава с откритие – за първи път се установява пролиферативен ефект на препарат от групата, на широко прилаганите в клиничната практика, статини.

Към дисертантката имам следните въпроси: Каква е клетъчната специфичност на ERK1/2 и как използваните антитела различават ензимните изоформи? Какъв е възможният механизъм за транслокацията на ERK от цитозола в плазматичната мембрана?

Заклучение: Дисертацията на Ралица Бориславова Скробанска е значим за биологичните науки труд. Той илюстрира включването на различни сигнални пътища за обмен на информация между генома и околната среда, посочва свършените механизми на адаптация, характерни най-вече за висшия човешки организъм. Дисертационния труд е с методичен принос за експериментаторите биолози и клиницисти, ангажирани с изследване на сигналните каскади в норма и патология. Публикациите свързани с дисертацията, напълно отговарят на изискванията и аз с голяма убеденост ще гласувам за присъждането на Ралица Бориславова Скробанска научната и образователна степен „Доктор”, което предлагам и на другите участници в журито, а на Ралица Бориславова Скробанска, пожелавам здраве и много бъдещи успехи в тази ценна област на биологичните науки.

8.08.2011г.
София

Доц. Калина Вапцарова