

## РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационен труд за получаване на научната и образователна степен „доктор”**

Автор на дисертационния труд: **Надежда Петрова Стефанова**

Тема: **„Структурно-функционални зависимости в плазмени мембрани на клетки, култивирани в триизмерни условия”**

Рецензент: проф., дбн Елена Владимирова Стефанова

Един утвърден и широко използван метод в клетъчна биология и медицината за изследване и анализ на жизнените процеси в клетките, е култивирането на клетки *in vitro*. Нормалното протичане на всички процеси като растеж, развитие, диференцировка, програмирана клетъчна смърт, както и патологичните отклонения водещи до злокачествена трансформация, са пряко свързани с адхезивните свойства на клетките, чрез контакта и взаимодействието им с т.н. извънклетъчен матрикс (ИКМ). Известно е, че тази сложна система от макромолекули - (ИКМ) повлиява както структурната организация, така и функционалното поведение на клетките в норма и патология. Ключова роля в тези взаимодействия имат интегриновите рецептори, които регулират двупосочното предаване на сигнали към клетката и от клетката навън и така контролират жизнените процеси. Днес се поставя под съмнение факта, че конвенционалните *in vitro* условия за култивиране могат да имитират точно естествените условия в живия организъм. Това обуславя стремежа към търсене на алтернативни подходи в конструирането на системи, отговарящи напълно на *in vivo* поведението на клетките в многоклетъчния организъм. Важен момент в създаването на една нова *in vivo* триизмерна моделна система е да се

анализира ефекта и върху адаптирането, поведението и функциите на клетките, както и в индуцирането на адекватни отговори при промени в условията на средата. Във фокуса на тези изследвания е клетъчната периферия и по-конкретно динамиката във фините взаимодействия на нейните молекули, организацията на адхезивните комплекси, както и модулиращият ефект на извънклетъчния матрикс, актуални въпроси на които е посветен настоящия дисертационен труд. Едно комплексно и задълбочено изследване, с модерни подходи и богата информация от данни, които определят дисертационния труд като актуален и с широко практическо приложение в медико-биологичните изследвания.

Дисертацията обхваща 137 страници от които: 55 - литературен обзор, 1 страница цели и задачи, 23 – материали и методи, 50 - резултати и дискусия, 2 страници изводи. Цитираната литература включва 151 заглавия на латиница, от които приблизително 60 са през последните пет години. Илюстрирана е с 38 фигури от които 28 цветни, 10 таблици и 1 цветно приложение.

Изложението е представено коректно, написано на много добър стил, който определя автора с висока научна и езикова култура, с обширни познания по изследвания проблем и владееене на съвременни техники и подходи за реализиране на целите в изследването.

Литературният обзор е стегнат и подреден, структуриран много добре и включва богата информация по проблема. Представени са в детайли компонентите и молекулната организация на различните модели биологични мембрани, високата степен на хетерогенност, специфичните липид-липидни, белтък-белтъчни и липид-белтъчни взаимодействия, участващи активно в междуклетъчната сигнализация. Особено внимание е отделено на мембранната асиметрия, значението и за физиологичните и патологични процеси в клетките, на флуидитета, подредеността и фазовата сепарация на биологичните мембрани.

Представена е обширна информация за липидните рафтове и съвременната концепция за ролята им като платформи, привличащи сигнални белтъци и улесняващи формирането на сигналните комплекси и значението на кавеолин 1 във формирането на рафт-подобни мембранни домени. Не на последно място са разгледани интегрините като трансмембранни рецептори, ефекта им върху реорганизацията на цитоскелетните елементи, различните адхезивни контакти и централната роля на различните кинази в интегриновата сигнализация.

Целта и задачите са формулирани ясно и логично следват литературния обзор, като се отнасят по-конкретно до:

1. Морфологично характеризиране на триизмерната система (3D) за култивиране на фибробласти и сравнителна характеристика на липидния състав на мембраните им при култивиране в 2D и 3D условия и

2. Анализ на структурната организация на липидния бислой и на влиянието на  $\beta 1$ -интегриновите рецептори върху липидния състав на плазмените мембрани в 2D и 3D култури.

Методичните подходи са подбрани адекватно на поставените задачи. Представени са в детайли клетъчните линии с които са извършени експериментите - миши ембрионални фибробласти GD25 $\beta 1_A$  и GD25 $\beta 1^{-1}$ . Прецизно подбраните съвременни подходи - получаването на 3D култура и на матрикс, продуциран от клетките заедно с хистохимичния анализ, получаването на клетъчни лизати и тяхното характеризиране чрез РАА-гел електрофореза и Western blot анализ и FACS анализ на клетките, говорят за високото качество на извършените експерименти. Една част от експериментите включват определяне на тотален белтък и на количеството тотални фосфолипиди в липидни екстракти от изолирани плазмени мембрани. Успоредно са анализирани чрез тънкослойна хроматография фосфолипидите, а чрез

газово-хроматографски анализ мастните киселини и холестерола и е определена асиметрията в разпределението на холестерола между двата монослоя на плазмените мембрани. Всички приложени методи показват, че докторантката е усвоила и владее доста широка гама от съвременните методични подходи.

Извършената експериментална работа представлява едно задълбочено и детайлно изследване на поведението на клетките, на връзката на клетките с извънклетъчния матрикс, а от тук и на междуклетъчната сигнализация при култивиране на фибробласти в *in vivo* условия, имитиращи до голяма степен естествените условия в живия организъм. Резултатите от поставените експерименти са важни не само от теоретична гледна точка, но и от гледна точка на приложението им в областта на медицината, което определя и техния приносен характер.

1. От проведените изследвания за получаване на *in vivo* матрикс, за първи път чрез хистохимично оцветяване е определена гъстотата в разпределението на клетките в 3D условия на култивиране и е визуализиран белтъчният скелет, изграждащ структурата на извънклетъчния матрикс. Удачното комбиниране на този метод със сканираща електронна микроскопия дава една по-пълна и прецизна картина за сравнението на морфологията на фибробластите в 2D и 3D култури и синтезираните от тях матриксни структури.

2. Представени са доказателства за разликите в процентното съдържание на фосфолипидите в мембраните на клетките от 2D и 3D култури, като се запазва тенденцията за по-голям процент фосфолипиди изграждащи рафтовете - SM и холестерол, в 3D и по-малък процент на PI и PC. От друга страна е установено, че значително се повишава съдържанието на холестерола - повече от 60 % в плазмените мембрани в 3D културите в сравнение с 2D културите,

докато асиметрията в разпределението на холестерола в двата монослоя на мембраната е по-слабо изразена в 3D, в сравнение с конвенционалните 2D култури, както и степента на мембранна подреденост.

Поради голямото влияние на мастните киселини върху структурната подреденост и фазовото поведение на липидите в мембраната, т.е. върху свойствата на клетъчната мембрана, са анализирани в детайли мастнокиселинния състав на фосфолипидите в мембраните на клетки от 2D и 3D условия и е установено, че:

3. Съдържанието на моно- и полиненаситените киселини се увеличава, а намалява съдържанието на наситените мастни киселини във фибробластите от 3D култури, в сравнение с тези от 2D, като само при SM се наблюдава обратната тенденция, а именно – увеличават се почти всички наситени, а намаляват всички ненаситени мастни киселини.

4. В подкрепа на извод 2, чрез използване на предимствата на метода на гигантските униламеларни везикули, са получени оригинални резултати за различната латералната хетерогенност на плазмените мембрани и различната склонност към формиране на липидни домени и при двата типа условия на култивиране.

5. Установено е, че култивирането на фибробласти в 2D условия е свързано с по-ниски нива на експресия на кавеолин-1, като белтъчен компонент на рафт-подобните домени, в сравнение с тези, наблюдавани в *in-vivo* подобните условия, което е сигнал за по-подредени мембранни домени в 3D културите и модулиране на свързаните с тях сигнални молекули..

6. Показана е динамиката в количеството и степента на активиране на  $\beta 1$  интегриновите рецептори в мембраните на двата типа фибробласти и е доказано, че  $\beta 1$  интегрините имат ефект както върху

съдържанието на холестерола, така и върху определени фосфолипиди в условията на 3D, което не е свързано с количеството или степента им на активиране в плазмените мембрани.

В последната част от дисертацията е представено задълбочено и прецизно обсъждане, което е свързано с коректна обосновка на получените резултати и е съпоставено адекватно с известните данни в литературата по проблема. Докторантката много аналитично съпоставя и сравнява всички съществени разлики в изследваните характеристики на плазмените мембрани в различните условия на култивиране, като накрая очертава общите тенденции типични за клетките от 3D култури. Нещо повече тя умело вплита своята интерпретация за възможните причини, съпътстващи промените в състава и организацията на плазмените мембрани, които рефлектират върху сигналните пътища в клетките и така влияят върху всички клетъчни функции. Не на последно място тя е очертала насоките в бъдещите изследвания, което показва, че докторантката е запозната в детайли с посоките на изследване, които биха дали категоричен отговор на всички възлови въпроси, чрез използване на новата *in vivo* подобна триизмерна структура, като удачна алтернатива на конвенционалните двуизмерни системи за култивиране.

Авторефератът отговаря на изискванията, съответства по съдържание на дисертацията, като добре са балансирани отделните части от дисертационния труд. Резултатите са оформени в 3 публикации, 2 от които са в реномираните международни списания, *Cell Biochem Biophys*, с ИФ 3.34 (по citation index за 2010 година) и в *Cell Biol Internacional*, с ИФ 1.8, а 1 е в българско списание и са докладвани на 1 международна и 2 национални конференции. Отбелязан е 1 цитат.

**Заклучение:** Тематиката на дисертационният труд на Надежда Стефанова е много актуална, доколкото това са първи стъпки в търсенето на “комфортни” условия за отглеждане на клетките, имитиращи реалните условия в живия организъм. Получени са оригинални резултати, които показват от една страна, че такива *in vivo* подобни условия са по-благоприятни за реализиране на процесите на регулация и сигнализация на клетките, а от друга за моделиране на сигналите при патологични състояния на клетките, както и за терапия на процесите свързани с фибропролиферативни заболявания. Работата е много добре оформена и има висока научна стойност. Направените изводи са логични и дават ясни отговори на всички поставени въпроси. Затова убедено препоръчвам на почитаемото жури, да присъди на Надежда Петрова Стефанова научната и образователна степен “доктор”.

27.08.2011

Рецензент:

/проф., дбн Е. Стефанова/