

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд на Надежда Петрова Стефанова, озаглавен:

„Структурно-функционални зависимости в плазмени мембрани на клетки, култивирани в триизмерни условия“ – представен за присъждане на научната и образователна степен „доктор“

Рецензент: ст.н.сътр. I ст. Х.Челибонова-Лорер, дбн.

1. Уводни бележки. Докторантката Надежда Стефанова е завършила с отличен успех висшето си образование по биология в Биологическия факултет на СУ „Климент Охридски“ и е преминала магистърска програма по „Клетъчна биология и патология“. Със съответна заповед е зачислена за редовен докторант по специалността „Клетъчна биология“ към катедра „Цитология, хистология и ембриология“. Аprobацията на труда е проведена на разширен Катедрен съвет, на който участниците в съвета при своите изказвания, посочиха положителните страни на дисертационния труд и че докторантката може да се яви на защита. Въпреки че представената документация е изрядна и изчерпателна, учудващо е, че липсва автобиографията на кандидатката.

2. Общи данни за дисертацията. Трудът е разгърнат на 123 страници, като уводът и литературният обзор заемат 55 страници, разделът за материали и методи е изложен на 13 страници, а резултатите и обсъждането им на 49 страници. В труда се съдържат 38 фигури, 9 таблици и едно приложение. Книгописът обхваща 151 източника изцяло от журнални статии в чуждестранната литература включително и от 2010 година, цитирани са статии и от български учени – Панков и Момчилова, Лупанова и др. От библиографска гледна точка, посочените данни в списъка на литературата са точни и коректни. Представен е и списък от 3 публикации във връзка с дисертацията, в 2 от които Стефанова е на първо място. Има участие в 3 научни форума.

3. Анализ на дисертационния труд. Литературният обзор е написан компетентно и се чете с удоволствие. Могат да се очертаят два основни раздела, свързани с темата на труда, намерили място в прегледа на литературата – детайлно проследяване на трудове отнасящи се до системите за клетъчно култивиране ин витро, като силен акцент е поставен върху съществените различия по отношение на състав, структура и биофизични свойства между клетки от един и същ вид, култивирани конвенционално в двуизмерни и съответно в триизмерни условия. В двуизмерните ин витро системи липсва извънклетъчен матрикс, което причинява на клетките съответен стрес, който предизвиква появата на изменения в адхезивните контакти на клетъчната

повърхност. В резултат от това се засягат редица сигнални пътища, така че функционирането на клетките се променя и не може резултатите от изследванията върху такъв модел, да се отнесат до нормалните показатели на клетките, развиващи се в условия на живот *in vivo*. Съществуват данни в литературата, описани в обзора, за работа при лабораторни условия с клетки култивирани така, че да се образуват триизмерни култури, силно наподобяващи клетъчната организация *in vivo*. Пионерни данни в това отношение са описани още през 2001 г. (Science, v.294, 23), от колектив на Yamada et. al., в който съавтор е проф. Панков. Поради това създаването на нова система за култивиране на фибробласти, така че да се изгради триизмерна култура силно наподобяваща растежа на клетките в условия *in vivo* е важно предимство за лабораторните опити. Многогранното изучаване характеристиките на тези клетки може да обогати познанията ни в областта на клетъчната биология, а също така и относно биофизичните аспекти на клетъчните контакти. При анализирането на литературните данни от последните 10-15 години от погледа на Стефанова не са убегнали възловите въпроси относно най-новите постижения на мембранологията – наличие на рафт домени в плазмените мембрани, тяхната роля, състав и функция, разгледани са въпросите за интегрин-съдържащите адхезивни контакти, а именно основните от тях – фокалните контакти и фокалните адхезии, които съдържат специфични интегрини – рецептори за определени белтъци, като витронектин, фибрин, винкулин и др. Посочени са данни за ролята на интегрините като медиатори в осъществяването на подредеността на богатите на холестерол домени в цитоплазмените мембрани на фибробластите. Богата е и информацията относно кавеолите и ролята на кавеолина. Давам висока оценка на обзора и на включените в него илюстрации, заимствани от литературата, тъй като в него са представени не само най-новите данни, но и защото по логичен начин насочва към темата на труда.

Имам и някои забележки:

- В посочената под № 72 статия в списъка на ползваната литература липсва годината на отпечатването.
- Цитираната работа на Панков и Момчилова не е отразена в библиографията.
- Допусната е вероятно печатна грешка в „Увода“ терминът “фармацевтична“ е написан с „в“ вместо с „ф“.

Целта е формулирана ясно и директно насочва вниманието върху оригиналността на изследването, тъй като експерименталният модел е новосъздадена триизмерна система за култивиране на фибробласти, като се цели да се установят в новоизградения триизмерен клетъчен слой структурно-функционалните зависимости в клетъчните плазмени мембрани. За реализирането на тази цел Стефанова си поставя последователното решаване на

4 взаимно свързани задачи – преди всичко клетките да се охарактеризират морфологично, след което следват последователно анализи върху състава – главно този на липидите в изолираните от тях плазмени мембрани, чрез биофизични подходи да се разкрие структурната организация на липидния бислой и да се потърси отговор на въпроса доколко и как бета интегриновите рецептори влияят върху липидния състав на клетъчните мембрани. Изследванията се провеждат в сравнителен аспект между клетки култивирани в 2Д и 3Д условия. Прави впечатление, че въпросът за състава на липидите в мембраните на клетките се третира при извеждането на заключенията относно структурно – функционалните зависимости в мембраните и се питам, дали и този параметър не е следвало по някакъв начин да фигурира в заглавието на дисертацията.

Разделът за материали и методи е написан така, че задоволява напълно изискванията за пълнота и яснота. Нещо повече – дава представа не само за много големия обем извършена изследователска работа, но и за използваната по адекватен начин съвременна техника и апаратура. Диапазонът от приложените методи е широк – варира от лабораторни умения за поддържане на клетъчни култури, подготовка на срези за хистологичен анализ със светлинен микроскоп, приложение на сканираща електронна микроскопия, химични анализи за съдържание на белтък и липиди, мастнокиселинен състав на липиди, моделиране на латералната хетерогенност на мембраните чрез прилагане на гигантските униламеларни везикули /ГУВ/. Всички данни са обработени след вариационно-статистически изчисления и са представени като средно-аритметични със средната им грешка и е даден коефициента за достоверност.

Имам и следните бележки:

- на стр.57 е посочено, че съдовете за култивиране са били „коатирани“ с 0.5% желатин. Можеше да се използва българска терминология.
- стр.58 – описана е среда за култивиране, за която се казва, че е с високо съдържание на глюкоза – пита се какво е то?
- стр.61 – използван е изреча „сваряване“ и по-долу в текста – термина „акселератори“.
- стр.63 – казано е сукрозен градиент вместо захарозен както е прието; грешно е написана формулата на натриев бикарбонат.

Както се вижда нямам сериозни забележки, но ги посочвам за коректност.

Резултатите са много подробно изложени и искам да изразя положителната оценка, която заслужават представените илюстрации, фигури и

диаграми. Освен това прави отлично впечатление и извършването на многобройни контроли, което вдъхва увереност и дава основа за реалистично тълкуване на получените резултати. Това е и важна гаранция за постигнатото ниво на експериментаторската зрелост на докторантката.

Данните от хистохимичните изследвания на 3Д култура на безспорно доказват, че клетките са заобиколени от извънклетъчен матрикс богат на колаген, а чрез сканираща микроскопия се доуточнява, че матриксът се изгражда от белтъчни фибрили вероятно от фибронектин, върху които се наслагват колагеновите влакна.

Сравнителният анализ на фосфолипидния състав в плазмените мембрани на клетки в 3Д култура се отличава от същия установен при мембрани от 2Д клетки по отношение на почти всички фосфолипидни представители. Не би могла да се изведе закономерност, но могат да се подчертаят разлики, които да характеризират ФЛ състав в ПМ на 3Д клетките, а то е повишеното съдържание на SM, PE и PS в сравнение с това на 2Д клетките.

По отношение на наблюдаваните различия в мостнокиселинния състав на основните фосфолипиди, констатирани в състава на плазмените мембрани от 2Д и 3Д културите, забележителни различия се установяват в относително по-високото съдържание както на моно, така и на полиненаситените киселини в клетките от 3Д културата, докато при сфингомиелина от тези клетки се наблюдава обратната тенденция – по-ниско съдържание на ненаситени мастни киселини. Данните приведени към възприетия коефициент, наречен индекс на наситеност, разграничават 3Д от 2Д културите с по-високо ниво на ненаситените мастни киселини, като това не важи единствено за сфингомиелина от мембраните на 3Д фибробластите. Друго отличително различие е установеното с 63% по-високо съдържание на холестерол в 3Д клетките, а това е показател, който има непосредствена връзка със структурната организация на мембраните, тъй като е известно от литературата, че количественото съдържание на холестерола играе роля за поддържането в плазмената мембрана на нейната структура и функция. Изследването на неговото асиметрично разположение между двата монослоя показва, че в мембраните на 3Д клетките тази асиметрия е по-незначителна в сравнение с намерената при 2Д клетките, в които холестерола е локализиран предимно върху външния монослой. Възниква въпрос – как това разминаване между клетките от двете култури по отношение на сфингомиелина и холестерола дава отражение върху възможностите за окисление на холестерола. Повишеното ниво на сфингомиелина в мембраните на клетки култивирани в триизмерни условия води до промени и във физико-химичните свойства на мембраните, в структурната им организация, латералното липидно разпределение, което се отразява на процеса на формиране на рафт-домените, а от там върху клетъчната сигнализация. Интересни данни са получени при изследването на въпроса как влияят липидните екстракти от мембраните на 3Д клетките върху степента на

подреденост, като за целта е било анализирано съдържанеито на кавеолина – белтъчен компонент на рафт-подобните домени. Резултатите показват, че в триизмерните култури експресията на кавеолин е повишена. Считам, че сравнителните данни по отношение на интегрините и съответно интегриновите рецептори в 2Д и 3Д култивираните фибробласти имат оригинален характер, очертават нови, неизвестни до сега в литературата резултати и доказват, че не количеството на интегрините в мембраната е фактора в 3Д културата за функцията на интегриновите рецептори, а тяхната локализация, която дефинира адхезивните контакти. Логично и последователно са интерпретирани и данните за повишеното съдържание на PS и съответно по-ниското количество на PI, което се обяснява с разпределението на зарядите по мембранната повърхност. Очертават се перспективи за изследвания на нови аспекти по проблема. Логично е да се предположи, че по-високата флуидност на мембраните би оказала влияние върху активността на мембранно-свързаните ензими, върху транспортните механизми, сигналните пътища – все въпроси, които очакват своето решение.

Обсъждането е много обективно, задълбочено, направено е с очевидна предпазливост при изказването на предположения, което за мен е гаранция за изследователска зрелост. Присъединявам се към направените изводи, като бих си позволила да обърна внимание на извод 4, където е казано, че „фибробластите проявяват склонност към“, може да се потърси по-научно издържан израз.

Високо оценявам както извършената голяма по обем работа, така и качествата на представения труд.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Извършена е квалифицирана изследователска работа, при това отговаряща на съвременните високи стандарти в тази област. Представените данни са личен принос на докторантката. Наукометричните показатели са покрити, две публикации с общ ИФ – 5.14 и една публикация на български език. Има 2 участия в научни форуми. Въз основа на тези аргументи предлагам убедено на уважаемите членове на комисията да бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ на Надежда Петрова Стефанова.

София, 26.08.2011г.

Рецензент: ст.н.сър.Ист.

Х. Челибонова-Лорер, дбн