

С т а н о в и щ е

От професор Росица Конакчиева, дбн,

Върху дисертационен труд на тема:

**„Фибробластно активиране в триизмерни ин-виво подобни условия“
на Александър Виктор Евангелатов,**

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в
професионално направление 4.3. Биологически науки (клетъчна биология)

Дисертационният труд на Александър Евангелатов има за обект изучаването на сигнални механизми на фибробластно активиране в наподобяващи организмовата среда триизмерни ин-витро условия. Процесите на фибробластно активиране и/или препрограмизиране ин-виво са недостатъчно изяснени и изведените клетъчни механизми имат ограничено приложно значение поради спецификите на монослойното култивиране и промените в клетъчното поведение, свързани с тези техники. Култивирането на клетъчни типове като фибробластите, анажирани активно в ремоделирането на извънклетъчния матрикс, изисква максимално приближаване до ин-виво условията с цел адекватно изучаване на клетъчните механизми на диференциация и сигнализация на генната транскрипция. В методологията на клетъчното култивиране навлизат иновативни триизмерни моделни системи, основани на използването на изкуствени материали или базирани на естествени компоненти на екстрацелуларния матрикс, които позволяват по-детайлно и по-точно характеризиране на клетъчните функции. Разработването на подобни системи има важно приложно значение за медицинската практика и е свързано със създаването на иновативни биотехнологични продукти за клетъчна терапия и регенеративна медицина. В конкретния случай, авторът е успял да разработи система за изучаване характеристиките на клетъчното поведение при дегенеративно заболяване на кожата с важно социално икономическо значение каквото е т.нар. „диабетно стъпало“ – последици от некомпенсиран захарен диабет.

За целите на настоящия дисертационен труд е използвана триизмерна моделна система от нативен екстрацелуларен матрикс, синтезиран от фибробластна линия GD25beta1, която поддържа фибробластите в неактивно състояние. Моделната система е верифицирана чрез PCR анализ, МТТ тест и имунофлуоресценция, включително конфокална микроскопия, за наличието на основните компоненти на нативния екстрацелуларен матрикс характерен за дермата на кожата и разпределението на клетките в синтезирания от тях матрикс. Използван е креативен експериментален подход за предизвикване на миофибробластно активиране чрез механично нараняване на матрикса и са проведени експерименти за определяне сходствата и различията в клетъчната сигнализация при различните условия. Допълнително е проведено характеризиране на фибробластното поведение при дву- и триизмерни условия.

Проведени са експерименти за въздействие върху подобрени молекулно-биологични сигнални каскади с цел индуциране на миофибробластна диференциация в условия на култивиране, наподобяващи тези при синдром на „диабетно стъпало“. Разработената система с добавяне на фибринов гел след нараняване осигурява триизмерни условия, в които фибробластите могат да мигрират, като в същото време се създава възможност за добавяне на растежни фактори с цел изучаване ролята им в процесите на зарастване на рани. Патологията в процесите на тъканно ремоделиране, свързано със зарастване на диабет-предизвикани рани, е изследвана върху модел допълнен с променливо съдържание на глюкоза.

Използваните модели са подобрени подходящо, като при всеки отделен случай е провеждана верификация на основните компоненти за даденото състояние в норма и по отношение на двуизмерни условия на култивиране. Важно достойнство на работата е творческият подход за експериментиране и богатият набор от отлично изпълнени и компетентно интерпретирани молекулярно-биологични и клетъчно-биологични анализи. Между тях се открояват експериментално нараняване и възстановяване целостта на нативна триизмерна култура от GD25β1 фибробласти, морфологичен и морфометричен анализ, имунофлуоресцентен анализ, трансфекция на GD25β1 фибробласти за получаване на стабилни клетъчни линии експресиращи actin-mRFP, SDS-PAGE и Western блот анализ и PCR анализ за голям брой компоненти на екстарцелуларния матрикс, сигнални растежни фактори и рецептори за тях, фармакологични експерименти с TGFβ1, индуциране на диабет в лабораторни плъхове, ELISA, анализ на изображения, статистически анализ. Използването на тези разнообразни подходи свидетелства за творческия изследователски дух на автора, неговата способност за интерпретация на научни факти, както и способността му да прилага адекватни методи за доказване на научно-експерименталната си хипотеза. В съвкупност тези характеристики убедително подкрепят представените оригинални научни данни.

В резултат на дисертационния труд са изведени важни оригинални приноси с фундаментално и приложно значение, свързани с въвеждането на нативна триизмерна моделна система за култивиране, изследване на сигнална трансдукция и миофибробластна диференциация при зарастване на рани. Този подход предоставя ин-витро условия приближаващи в значителна степен естествените условия в организма и дава възможност за оценка на влиянието на участващите молекулно биологични механизми при индуцирането, развитието и лечението на сходни патологии. Получените резултати дават сериозно основание за задълбочаване на тези изследвания, и приложението им за алтернативни лекарствени тестове в една интензивно разработвана медикобиологична област.

В заключение, като отбелязвам несъществени технически пропуски при оформянето на дисертационния труд, изказвам високо положителната си оценка за оригиналността на темата и приносите, методичното изпълнение и научната интерпретация на изложените експериментални и литературни данни. Предлагам на уважаемите членове на Научно жури съгласно Заповед на Ректора на СУ „Св. Кл.

Охридски“ РД-38-89/03.02.2015г., да присъдят на Александър Виктор Евангелатов образователната и научна степен „доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (клетъчна биология).

12.03.2015, София

Изготвил становище:

/проф. Росица Конакчиева, дбн/