

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Румяна Цонева

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия“ – ИБФБМИ, БАН

Относно дисертационен труд насочен за публична защита за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология) на докторант Светлана Иванова Иванова на тема „Клетъчен биосензор за оценка на повърхностна биосъвместимост“ с научни ръководители: чл.кор. проф.дбн Румен Панков и доц. д-р Стоян Чакъров

Процедура на обявяване на публичната защита

Светлана Иванова Иванова е зачислена за докторант на самостоятелна подготовка към Биологически факултет към катедра „Цитология, хистология и ембриология“ и е отчислена с право на защита със заповед № РД 20 -1775/16.11.2017 г.

Със заповед № РД 38-692/16.11.2017 на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ е назначено Научно жури за провеждане на защитата. На първото заседание на НЖ бях определена за рецензент на докторантския труд.

Декларирам, че нямам общи публикации с докторантката.

За изготвяне на рецензията докторантката Светлана Иванова Иванова е представила всички изискуеми материали (дисертация, автореферат, публикации, автобиография). Рецензията е изготвена съгласно изискванията на ЗРНСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника за прилагането му в СУ „Св. Кл. Охридски“.

Биографични данни на кандидата

Светлана Иванова Иванова получава бакалавърска степен по биотехнологии в СУ „Св. Климент Охридски“ през 2002 г. През 2002 – 2004 е магистър в СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, по специалността „Генно и клетъчно инженерство“. Работила е като биотехнолог в Научно технологично обслужване ООД,

продуктов специалист в Ридаком ООД, сътрудник по управление на документацията в Куинтайлс България ЕООД и в момента е на длъжност ТМФ специалист в Куинтайлс България ЕООД. Заслужава да се отбележи и участието ѝ в четири проекта към Фонд научни изследвания и владенето на множество молекулярно биологични, имунологични и имуно-цитохимични техники.

Актуалност на дисертационния труд

В настоящата дисертация е разработен клетъчен биосензор базиран на експресията на хибридни флуоресцентно белязани белтъци за проследяване на клетъчните адхезивни контакти при оценка на биосъвместимостта на различни материали с биомедицинско приложение. Предимството на клетъчния биосензор пред молекулярните биосензори се състои във възможността за регистриране и реагиране на множествени стимули като адхезивност, химичен състав, еластичност и топология. В допълнение настоящият дисертационен труд чрез използването на разработения клетъчен биосензор предлага и набор от *in vitro* тестове за универсална, комплексна и количествена оценка на адхезивните свойства на тестваните биоматериали. Това включва оценка и охарактеризиране както на клетка-извънклетъчен матрикс адхезионните контакти така и на клетка-клетка адхезионни контакти.

Това изследване безспорно представя един иновативен и универсален подход за изследване на биосъвместимостта на биоматериалите, който би бил много подходящ при подбора на нови биомиметични материали за целите на тъканното инженерство и регенеративната медицина.

Структура на дисертационния труд

Представената за рецензия работа разглежда необходимостта и създаването на клетъчен биосензор за целите на биомедицината на базата на основен клетъчен процес-клетъчната адхезия. Основанията за такова изследване са добре обосновани в литературния обзор: 1) Белтъци в клетъчните адхезивни контакти и тяхната роля за осъществяване на клетъчната адхезия 2) Ролята на различните адхезивни контакти в процеса на клетъчната адхезия и тяхната механосензорна функция 3) Компонентите на извънклетъчния матрикс и ролята им в процесите на клетъчна адхезия, миграция и колонизация. Всичко това дава и основанието за създаването и използването на клетъчен биосензор на основата на детекция на адхезивни клетъчни контакти при

изпитване на биосъвместимостта на нови полимерни биомимикращи матрици в тъканното инженерство и регенеративната медицина.

Дисертационния труд е написан стегнато и ясно. Структурирането му е съобразено с общоприетите съотношения между отделните раздели. Той съдържа 132 стандартни машинописни страници, от които въведение-1стр., литературен обзор – 35 стр., цел и задачи – 1стр., материали и методи – 20 стр., изводи – 1стр. и справка за приносите -2 стр., библиография – 12 стр. Резултатите са описани на 50 стр., като след всяка серия експерименти следва обсъждане. Цялостно обсъждане и обобщение на всички получени данни е направено на 3 стр. Резултатите от изследванията са представени в 3 съобщения на научни форуми и са публикувани в 2 статии с импакт фактор, като във всички Светлана Иванова е водещ автор. Изследването е онагледено с 34 фигури, схеми и снимки.

Литературният обзор показва добро познаване на известното по проблема, умението на докторантката С. Иванова да съпоставя и анализира данните така, че да покаже убедително необходимостта от планираните от нея проучвания. Той е структуриран в 3 основни раздела. Първият е посветен на взаимодействие на клетката със средата, видовете адхезивни контакти, тяхната динамика, извънклетъчен матрикс и основните белтъци участващи в осъществяването на клетъчната адхезия. Вторият разглежда полимерни биомиметични материали с потенциал за използване като матрици в тъканното инженерство и регенеративната медицина. Третият е свързан с разработването на биосензори на основата на живи клетки и техните преимущества пред молекулярните сензори, както и възможността им да бъдат използвани за тестване на биосъвместимост на биоматериали. Обобщението за състоянието на проблема по същество е обосновка на настоящето изследване. В него се посочва основно необходимостта от разработване на биосензор на основата на живи клетки, който оценява адхезивните свойства на биоматериалите. То от своя страна оценява пълноценното взаимодействие между клетките и средата/полимерния субстрат, което би довело до успешното колонизиране на биомиметичната полимерна матрица и в крайна сметка до възстановяване на съответна тъкан или орган, което е и крайната цел на регенеративната медицина.

Целта на проучването следва логично от направения преглед на литературата – да бъде създаден подходящ клетъчен биосензор, чрез който да се провери хипотезата, че

клетъчните адхезивни контакти и клетъчната морфология могат да се използват за стандартизирана оценка на повърхностна биосъвместимост на биоматериали.

Произтичащите от целта **задачи** са 6 • Да се създаде биосензор на основата на живи клетки, който устойчиво експресира хибридни флуоресцентни белтъци от клетъчните адхезивни контакти; подбиране на критерии за оценка на повърхностна биосъвместимост на естествени и изкуствени субстрати; изработване на подход за количествено преобразуване на образната информация в числов вид; стандартизиране поведението на биосензора; анализиране на субстрат с неизвестни свойства чрез биосензора и да се изготви оценка за адхезивните качества на субстрата и изследване на поведението на биосензора върху субстрати с вариращи механични свойства.

При изпълнението на задачите, които си поставя дисертационният труд са използвани добре подбрани, адекватни, информативни и различни по характер методи и експериментални модели, които са предпоставка за получаване на точни, прецизни и достоверни резултати.

Докторантката е използвала при обработката на дигиталните изображения аналитичен софтуер Image J и денситометричен анализ за количествена оценка на имуноблотовете. При определяне на статистическата значимост е използван Student t-test, а при обработка на резултати на много групи е проведен вариационен еднофакторен анализ ANOVA и пост тест Tukey-Kramer при използването на софтуер InStat.

Представената принципна постановка на експеримента допринася значително за възприемането на получените резултати.

Експерименталните резултати са групирани, представени са прецизно и ясно, добре онагледени с фигури и снимки и подробно анализирани. При обсъждането проличава умението на докторантката да съпоставя критично и безпристрастно собствените резултати и литературните данни и така да изгражда хипотези и обяснения за наблюдаваните ефекти. Въз основа на получените при проучването собствени данни, техния анализ и сравняването им с подобни в световната литература, докторант С. Иванова е извела 5 извода, които имат приносен характер и отразяват успешното разработване и изпитване на първият флуоресцентен биосензор на базата на живи клетки оценяващ адхезивното поведение на полимерни субстрати и картографирането

на адхезивния им потенциал. Създаденият метод за оценка на повърхностната биосъвместимост на биоматериалите обогатява значително съществуващата методология за определяне на биосъвместимост, като той дава възможност едновременно да бъдат оценявани различни свойства на субстрата като напр. топология и еластичност. Използването на стабилна клетъчна линия в изработването на биосензора и дефинирани параметри гарантира възпроизводимостта на резултатите при изпитването на нови материали, което е гаранция за достоверността на получените данни. На базата на така изградената стратегия могат да бъдат създавани и по-специализирани биосензори за специални биоматериални приложения като например ендотелиални биосензори за изкуствени кръвоносни съдове, биосензори за тестване на костна биосъвместимост при създаване на изкуствени костни тъкани и т.н. Като цяло създаденият подход би подпомогнал скрининга на биосъвместимост на редица нови материали с приложение в регенеративната медицина. Биосензорът би намерил и по-широко приложение, като например, при изпитването и оценяването на различни основни клетъчни процеси като пролиферация, миграция, инвазия и ангиогенеза при редица патологични състояния.

Логично, изводите са в основата на дефинираните 2 приноса от дисертационния труд, които по достойнство описват значимостта на новосъздадения биосензор:

1. Разработен е нов тип флуоресцентен биосензор, при който отчитането се базира на топологията на сигналите, а не на промяната на интензитета или дължината на вълната на излъчената флуоресцентна светлина. За разлика от класическите новият биосензор се основава на постоянни сигнали, емитирани от два флуоресцентно белязани белтъка, които се локализируют в различни клетъчни контакти - фокалните и фибрилните адхезии.

2. За първи път е разработен систематичен подход за обща оценка на повърхностната биосъвместимост на биоматериали. Той е основан на комбинираното използване на жив клетъчен биосензор, набор от измерими параметри на клетъчната адхезия и карта на адхезивния потенциал, състояща се от средните стойности на тези параметри, измерени за пет естествени клетъчни субстрата.

Авторефератът отразява същността на дисертационния труд В него са отразени всички основни раздели на дисертационния труд и дава пълна представа за извършената работа, като акцентира върху най-приносните резултати от изследването.

Критични бележки

Представената за рецензия работа е написана на висок научен стил, с изчистени, стегнати и ясни изречения и правилна и точна пунктуация. Имам само малки забележки относно не дотам точното превеждане според мен на някои чужди термини като напр. коатиране“ на субстрата или „коатирани“ стъкла (от англ. coating), което би могло да се преведе като покриване на субстрата/стъклата, или използването на термина биомиметични „скелети“ (от англ, scaffolds), което би могло да се замести с биомиметични матрици или подложки.

Заклучение:

Извършена е голямо по обем, добре планирана, много трудоемка и прецизно изпълнена изследователска работа с голям брой и разнообразни методи допринасящи за високото качество на извършената работа. Обобщените резултати и направените изводи потвърждават важността от създаването на нов клетъчен биосензор за оценяване на биосъвместимостта на материали с приложение в тъканното инженерство и регенеративната медицина. Направените приноси са оригинални и значими, те имат както фундаментално, така и приложно значение в бурно развиващата се биоматериална наука. Докторантката показва, че е усвоила респектиращ брой разнообразни изследователски методи и техники, владее отлично литературата по проблема, умело и аргументирано интерпретира експерименталните резултати. Представеният материал отговаря на изискванията за защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”.

Поради това давам своята високо положителна оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност “Клетъчна биология” на докторант Светлана Иванова.