

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационния труд на Анелия Стефанова Костадинова за присъждане на образователната и научна степен „доктор” по Биологични науки, шифър 4.3

МОДУЛИРАНЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯТА НА КЛЕТКИ С ПОЛИМЕРНИ ПОВЪРХНОСТИ И МЕМБРАНИ

от проф. Диана Христова Петкова, д.б.н, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Значение и актуалност на проблема

Една от най-актуалната област в регенеративната медицина е създаване на нови биосъвместими материали за заместване на увредени тъкани. Успешното им приложение зависи не само от тяхната химична структура и физико-химичните им свойства, но и от тяхното взаимодействие с клетъчната повърхност. В основата на тези взаимодействия лежат процесите на адхезия, които са израз на взаимодействието на ЕЦМ и клетките.

В настоящата литература са публикувани редица изследвания свързани с подобряване на качествата на биосъвместимостта на материалите, но все още има някои нерешени проблеми свързани с механизмите на адхезия, които са едни от основните за подобряване повърхностната структура на материалите. Ето защо считам, че дисертацията третира един много важен и актуален проблем със значително приложение в практиката.

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат нови възможности за подобряване на взаимодействието на живите клетки с полимерни повърхности чрез вграждане на елементи от екстрацелуларния матрикс. Тя е много точно и ясно формулирана и изборът на конкретните задачи чрез решаването, на които да се даде отговор на поставения проблем са много добре подбрани.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд обхваща 117 стр, от които 38 стр. литературен обзор, 14 стр. методи, 23 стр. резултати, 11 стр. дискусия, 13 стр. списък на цитираната

литература. Дисертацията е оформена отлично като за илюстрация на някои по-съществени факти в обзора са представени 10 фигури. Резултатите са илюстрирани с 30 фиг. и 6 таблици. В дискусията са обяснени някои факти чрез използването на две схеми. На тях са онагледени ролята на хидрофобността на субстрата и евентуланата роля на дължината на ПЕГ веригите за такава конформация на фибронектина, която би довела до такава адхезия, която би осигурила запазване на функционалната активност на клетките. Съотношението между отделните раздели е добре спазено и отговаря на изискванията за структура на дисертационен труд.

Анализ на дисертационния труд

Литературата е систематизирана в няколко глави като подробно са описани молекулната структурата и свойствата на екстрацелуларния матрикс. Авторката е обърнала специално внимание на взаимодействията на клетките с базалната мембрана и нейната структура. Разгледани са адхезивните белтъци и специално внимание е отделено на структурата на фибронектина, ламинина и колагена, които имат съществена роля при процесите на адхезия. Разгледани са и структурата и функцията на интегриновите рецептори, механизмите на хомотипната адхезия. В литературния обзор е отделено внимание на свойствата на полимерните биоматериали, методите за модификация на повърхностите като е акцентирано върху ПЕГ и полиметилсилоксанови покритията и на взаимодействията на клетките с изкуствени мембрани използвани при биохибридни органи.

Така авторката логично е систематизирала данните в литературата за да покаже къде съществуват още неясноти по отношение на механизмите на адхезия и методите за подобряване на повърхността на биоматериалите с цел подобряване на взаимодействията им с клетките и въз основа на това да формулира конкретната цел и задачите, които да използва за решаването ѝ.

Литературният обзор е написан ясно и показва критично тълкуване на известните до сега литературни данни. Това говори, че Анелия Костадинова е добре подготвен в теоретично отношение учен. Има използвани чуждици на някои места, но това е неизбежно при представяне на такъв род литература.

За решаване на поставените задачи са използвани съвременни методи за покритие на повърхности с ПЕГ и за модифициране на повърхности с цел подобряване на взаимодействията с клетките. Така модифицираните повърхности са изследвани за

химичен състав и свойства със рентгенова фотоелектронна спектроскопия, атомна силова спектроскопия, измерване на контактните ъгли и чрез елементен анализ. При изследванията върху поведението на клетките и механизмите на адхезия са приложени модерни методи на клетъчната биология, имунология и биохимия. Всички техники са много подробно описани и могат да бъдат възпроизведени без да се използва допълнителна литература. Считаю, че подобрите методики са абсолютно адекватни за решаване на посочените задачи. Многобройните методи, които са използвани показват, че дисертантката е един много добре изграден експериментатор и й позволяват от различни страни да потвърди получените резултати.

В глава Резултати са представени данните от експериментите проведени за решаване на поставените задачи.

1. При изследване на клетъчната морфология на фибробласти при взаимодействие с покрити с няколко вида ПЕГ повърхности. Доказано е, че съществува спонтанна адхезия върху тези повърхности, която зависи от молекулното тегло на ПЕГ и тази адхезия съществено се подобрява при покритие на тези повърхности с фибронектин. Проследена е и адсорбцията на различни протеини върху ПЕГ повърхностите с цел доказване на механизмите на формиране на „ранен” и „късен” фибронектинов матрикс. Установено е, че използваните повърхности позволяват формирането на „късен” фибронектинов матрикс, което е от съществено значение за оценяване на биосъвместимостта на биоматериалите. Така е доказано, че новата полимерна повърхност има свойството да благоприятства формирането на екстрацелуларен матрикс, което е едно ново постижение в създаването на такъв вид материали.
2. Изследвани са адхезивните свойства на повърхности покрити с така наречения силиконов каучук, широко използвани като биоматериали в практиката. За да се намали хидрофобността на повърхностите те се функционализират с Ag^+ плазма, акрилова киселина и ПЕГ. Обработката с Ag^+ плазма подобрява образуването на ендегенен фибронектин, което показва, че това третиране е една нова възможност за биофункционализиране на някои повърхности.
3. За да се подобрят функционалните свойства на силиконовия каучук е имобилизиран колаген. Тъй като при имобилизацията свойствата на колагена като адхезивен протеин трябва да се запазят при този процес се използва

гъвкав спейсер обикновено от ПЕГ. Следващите изследвания са свързани с проучване, какъв вид ПЕГ би бил най-удачен при имобилизация на колагена. Доказано, че дължината на спейсера има голямо значение за експозиция на RGD секвенция на колагена, която осигурява оптимално взаимодействие с клетките и растеж на културите..

4. Изследвани са функционалните активности на модифицирани мембрани за изкуствени органи чрез хепатобластомна клетъчна линия. Чрез тези проучвания са създадени ко-полимери на акрилонитрил и 2-акриламид-2-метил-пропансулфонова киселина. За да се получат материали с различна порьозност е добавен полиакрилонитрил. Изследвана е повърхността на мембраните чрез атомно силова спектроскопия. Доказано е, че клетките имат склонност към адхезия към хомополимери. Изследван е и механизъмът на проявените различия при адхезия върху различни полимерни повърхности чрез проследяване на синтеза на фибронектин, E- кадхерин, винкулин от клетъчната линия.

Основният принос на дисертатнката е изследване на функционалната активност на модифицирани повърхности синтезирани от различни колективи.

Дискусията следва проведените експерименти, а не е една обобщена за изясняване на рзглежданите механизми. Бих искала да отбележа, че при представяне на резултатите има известна дискусия и за това считам, че дисертацията би само спечелила ако двата раздела Резултати и Дискусия бяха обединени, тъй като биха се избегнали повторенията в раздел Дискусия.

Бих искала да задам следните въпроси:

1. Защо докторантката е избрала като тест система за функционалността на последния вид изкуствени мембрани хепатомна линия клетки, а не хепатоцити, тъй като е известно, че адхезивните свойства на раковите клетки са много по-различни от тези на нормалните клетки ?
2. В раздел Материали и методи е описана подробно методика за определяне активността на цитохром P-450. В раздел Резултати е споменато, че като тест система за функционалната активност на хепатобластомни клетки адхезирани върху модифицирани мембрани е използвана експресията на този ензим. В дисертацията обаче няма данни нито за активността на цитохрома нито данни за експресията на белтъка. Известно е, че само по

активността на ензимите не може да се съди за тяхната експресия. Поради липсата на такива резултати как авторката би обяснила тези свои твърдения ?

Въз основа на проведените изследвания са направени 3 основни извода, които са ясно и точно формулирани.

Може да се отбележи, че дисертацията е оформена общо взето добре. Срещат се малък брой печатни грешки и използване на чуждици и неточности.

Изследванията от дисертацията са публикувани в 5 научни публикации. 4 от тях са в списания с ИФ, а едното е в българско специализирано списание. В една от статиите с ИФ, Анелия Костадинова е първи автор. Резултатите са представени и на научни конференции у нас и в чужбина. Забелязани са 12 цитирания в чуждестранни списания на трудовете свързани с дисертацията.

Авторефератът включва основните резултати от проведените изследвания и напълно отговаря на структурата на дисертацията..

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да кажа, че са получени оригинални резултати свързани с функционалната активност на нови биоматериали, основната част от получените резултати е публикувана в международни списания и за това препоръчвам на членовете на журито назначено със заповед No 422/3.10.2011 от Директора на Института по биофизика и биомедицинско инженерство да присъди на Анелия Костадинова научната и образователна степен „доктор” по Биологически науки шифър 4.2.

21.11.2011 г.

Рецензент:

Проф.. Диана Петкова