

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд “Фибробластно активиране в триизмерни, *in vivo*
подобни условия”

на Александър Викторов Евангелатов,
представен за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

Рецензент: професор Бойка Аначкова, д.б.н.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на Александър Евангелатов е изработен основно в катедра “Цитология, хистология и ембриология” на Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, където Евангелатов е зачислен като редовен докторант. Предмет на дисертационния труд е разработването на моделна система за култивиране на фибробластни клетки в три-измерни *in vivo*-подобни условия и изследването на патологията на синдрома на диабетното стъпало чрез експериментално нараняване и манипулиране на определени сигнални каскади за индуциране на миофибробластна диференциация в условия на висока концентрация на глюкоза, характерни за синдрома на диабетното стъпало. Този синдром е тежко усложнение при пациентите със захарен диабет, което се проявява с честота до 25% от боледуващите и представлява значителен проблем за общественото здраве. Лечението на синдрома е трудно и това прави изследванията за установяването на молекулярно биологичните причини за патологията особено актуални и важни за подобряване на терапията на това социално значимо заболяване. Тематиката на дисертационния труд е в една модерна област на клетъчната биология, насочена към изследване на клетъчната сигнализация в норма и патология, която е важна както във фундаментално, така и в практическо отношение.

Дисертационният труд е написан според класическата схема и качеството на илюстративния материал е добро. Той е написан на 110 страници, илюстриран е с 9 схеми, 31 фигури и 3 таблици. Библиографията включва 215

литературни източника. Общото оформление на дисертационния труд обаче, е небрежно, като например липсата на номерация на страниците, което затруднява рецензирането на труда.

Литературният обзор е балансиран и целенасочен и показва, че докторантът е ерудиран млад учен, който е добре запознат с въпросите, върху които работи. В обзора е направен преглед на структурата и функцията на кожата, активирането на фибробластите и свързаните с процеса болестни състояния, състава на извънклетъчния матрикс; обстойно е разгледана TGF β сигнализацията и ролята ѝ в индуцирането на миофибробластната диференциация по време на процесите на зарастване на рани; представени са най-общи данни за заболяването диабет и е обърнато по-специално внимание на синдрома на диабетното стъпало и на начините за неговото лечение. Значителна част от обзора заема прегледа на триизмерните системи за култивиране на клетки, като е направен сравнителен анализ на приложението на триизмерните системи, създадени от изкуствени материали и нативните триизмерни матрикси. Обърнато е специално внимание на предимствата на тези системи пред култивирането на клетките като монослойни култури.

Целите на дисертационния труд са формулирани точно и ясно. Във формулировката на задачите обаче, липсва достатъчно конкретика. От прегледа на изложените в раздела Материали и методи експериментални техники, може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантът се е изградил като високо квалифициран клетъчен биолог. Усвоени са модерни клетъчно и молекулярно биологични методи, като култивиране на клетки, имунофлуоресцентна и конфокална микроскопия, синтез на кДНК и PCR анализ, трансфекция на клетки, Western блот анализ, анализ на изображения, статистическа обработка на получените резултати и други. Приложените методи са достатъчно подробно описани в дисертационния труд и са адекватни за изпълнение на поставените цели и задачи.

От прочита на раздел Резултати и обсъждане се вижда, че е извършена значителна по обем работа. Резултатите са представени логично и ясно, без хиперинтерпретации. Накратко, получените по-значими резултати могат да

бъдат обобщени по следния начин. Първата задача на докторанта е била да охарактеризира извънклетъчния матрикс, продуциран от миши GD25 β 1 фибробласти при формиране на нативна триизмерна култура. Установено е, че нивото на експресия на основните компоненти на матрикса (колаген 1, 3 и 5, хиалуронан, фибронектин и еластин) не се различава статистически значимо при отглеждане на клетките в триизмерни условия от това в монослойни култури. Чрез конвенционална и конфокална имунофлуоресцентна микроскопия е изследвано пространственото разпределение на фибронектина, колагена тип I и ламинина и е намерено, че извънклетъчния матрикс се доближава до структурата на нормалната дермална тъкан. Чрез използването на GD25 β 1 фибробласти, експресиращи белтъка актин и антитяло срещу активен интегрин β 1 е показано, че за разлика от клетките, отглеждани в 2D условия, при отглеждането в 3D условия клетките придобиват *in vivo* подобна вретеновидна морфология и формират 3D матриксни адхезии. Тези резултати дават основание на автора да предположи и наличие на *in vivo* подобна сигнализация в 3D културата.

Следващата стъпка е разработването на *in vitro* моделна система за наранена дермална тъкан. Най-удачно се оказва нараняването чрез пробождане и запълване на освободеното пространство с фибринов гел, което запазва триизмерността на средата и имитира формирането на кръвен съсирек. За изследване на проблемите, свързани с диабетните язви, клетките са култивирани в среда с ниска и висока концентрация на глюкоза, съпоставима с тази установена при диабет. Трансформиращият растежен фактор β 1 (TGF β 1) е един от най-важните растежни фактори, участващи във фибробластната активация и последваща миофибробластна диференциация. Резултатите от експериментите за степента на автокринна експресия на фактора показват, че и двете култури синтезират TGF β 1, но синтезираното количество в условия на висока концентрация на глюкоза е по-ниско. Микроскопски наблюдения показват, че в условия на ниска концентрация на глюкоза наранените култури зарастват много по-бързо от отглежданите в среда с висока концентрация на глюкоза. Това наблюдение се потвърждава и с маркера за успешна

миофибробластна диференциация - синтезата на алфа-гладкомускулен актин, чиято синтеза в условия на хипергликемия не се повишава дори и след третиране на клетките с високи концентрации на TGF β 1. Western blot анализ с антитела срещу фосфорилирани Smad2/3 белтъци показва, че TGF β 1-сигнализицията не се осъществява по Smad-зависимата сигнална каскада в условия на хипергликемия. С аналогични опити е доказано, че и Smad-независимите сигнални каскади Ras-MEK-ERK и TAK1-p38 също не се активират. Изследвана е и възможността високата концентрация на глюкоза да повлиява нивата на експресия на рецепторите за TGF β 1. Проведените експерименти за първи път показват, че наистина хипергликемията подтиска експресията на рецептор тип 2 за TGF β 1, като по този начин вероятно се възпрепятства предаването на сигнали от TGF β 1 по Smad-зависимите и изследваните Smad-независими сигнални каскади и генерирането на съответните клетъчни отговори.

В търсене на механизми за подтискането на експресията на рецептора тип 2 за TGF β 1 в условия на хипергликемия са проведени серии от два вида експерименти. Първият е да се инхибира Rho сигналната каскада, а вторият е инхибиране на хистондеацетилази, хистонметилтрансферази и деоксицитозин метилтрансферази. Нито едно от тези третираня обаче не увеличава експресията на рецептора тип 2 за TGF β 1. Инхибирането на Rho сигналната каскада предизвиква обаче, ускорено зарастване на уврежданията в условия на хипергликемия без индуциране на миофибробластна диференциация. Хиперацетилирането на хроматина също води до ускорение на зарастването плюс индуциране на миофибробластна диференциация. Пилотните експерименти за епигенетично повлияване на зарастването на диабетни рани са интересни и ако те бъдат продължени е препоръчително включване на по-специфични методи като например ChIP анализ.

Приемам формулировката на изводите и приносите на дисертационния труд и смятам, че те интерпретират правилно получените експериментални резултати.

Списъкът на научните публикации, свързани с дисертационния труд е от 3 заглавия. Две от статиите съдържат оригинални експериментални резултати и са публикувани в списанията Доклади на БАН и Cell Proliferation (с импакт фактор е 3.28). Третата публикация представлява обзорна научна статия. В 2 от статиите Евангелатов е първи автор, което отразява неговата решаваща роля при изработването на публикациите. Докторантът е представил и резултати, свързани с дисертационния труд, под формата на постерни и устни доклади на 3 научни конференции, проведени у нас и в чужбина.

Авторефератът отразява правилно съдържанието на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд на Александър Евангелатов е посветен на важен и модерен научен проблем и получените резултати имат оригинален характер и представляват научен принос в изучаването на синдрома на диабетното стъпало. Разработената моделна система, базирана на нативна триизмерна култура от GD25 β 1 фибробласти е утвърдена в дисертационния труд като нова експериментална система за изясняването на етиологията на заболяването. Нещо повече, моделната система дава нови възможности за изпитания на лекарства и създаване на нови стратегии за лечение на синдрома на диабетното стъпало. Дисертационният труд е изработен на високо технологично ниво и разкрива авторът си като високо квалифициран клетъчен биолог. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Жури да присъди на Александър Виктор Евангелатов образователната и научна степен Доктор.

03.03.2015

София

/Бойка Аначкова/