

## СТАНОВИЩЕ

за дисертационния труд на тема “Фибробластно активиране в триизмерни, *in vivo* подобни условия “ на Александър Викторов Евангелатов  
от доц. д-р Анастас Господинов

Представеният ми за становище дисертационен труд е написан на 111 страници и съдържа 9 схеми, 3 таблици и 31 фигури. Цитирани са 215 литературни източника. Целта на дисертацията е да се изследват на механизмите, водещи до нарушена миофибробластна диференциация при диабет. Това нарушение от своя страна е свързано с развитието на т.нар. синдром на диабетното стъпало - тежко усложнение, настъпващо при значителен процент от диабетно болните. Казаното определя необходимостта да се разберат механизмите свързани с процеса, както и важността на разработваната от дисертанта тема.

Решимостта на всеки изследователски проблем изисква приложението на адекватна моделна система. Поради липсата на утвърдена такава, автора разработва оригинален тъканен модел на патологията, базиран на нативна триизмерна *in vitro* система за клетъчно култивиране, създадена от колектива в който работи.

Най-напред дисертантът характеризира изходната нативна триизмерна култура от фибробласт-подобни GD25 $\beta$ 1 клетки. Използвайки имунофлуоресцентно оцветяване за фибронектин, колаген и интегрин  $\beta$ 1, той установява, че съставът и структурата на извънклетъчния матрикс, както и морфологията на фибробластите и формираните 3D матриксни адхезии са подобни на тези в нормална дерма. Установява се понижено ниво на експресия на  $\alpha$ SMA (основен маркер за миофибробластна диференциация), в сравнение с конвенционална култура, което показва, че фибробластните клетки са в неактивно състояние, подобно на това в здрава дермална тъкан. Получените резултати показват, че нативната 3D култура притежава множество характеристики на моделираната тъкан. Това позволява на автора да продължи със създаването на модел на наранена дермална тъкан, като прилага експерименталната постановка в която след пробождање на клетъчната култура, освободеното пространство се запълва с фибринов гел. Този гел създава условия за пространствена миграция на клетките и едновременно наподобява формирането на кръвен съсирек. За да имитира диабетното състояние автора използва среда съдържаща 25 mM глюкоза. В условия на висока концентрация на глюкоза, модела на наранена дермална тъкан показва забавена клетъчна миграция, забавено запълване на раните и понижена експресия на  $\alpha$ SMA в сравнение с условията на ниска глюкоза. Установява се, че повишеното съдържание на глюкоза води до намалена експресия на TGF $\beta$ 1 - основен фактор във фибробластната активация и миофибробластна диференциация. За да провере дали дефицита на TGF $\beta$ 1 води до по-трудно активиране на фибробластите при възникване на нараняване, авторът изследва активирането на ненаранени култури при различна концентрация на глюкоза. Установява се, че при висока концентрация на глюкоза екзогенно добавения TGF $\beta$ 1 не води до повишаване експресията на  $\alpha$ SMA, което

предполага дефект във вътреклетъчната сигнализация. За проверка на тази хипотеза, дисертантът оценява експресията количеството на фосфорилирни Smad2/3 белтъци, след добавяне на TGF $\beta$ 1, като не намира активиране. Не се установява и повишаване на нивата на фосфорилиране на p38 и ERK киназите, което показва, че както Smad-зависимата, така и Smad-независимата сигнализация не могат да бъде активирани при висока глюкозна концентрация. На базата на този резултат, дисертантът прави логичното допускане, че високата глюкоза повлиява нивата на експресия на рецепторите за TGF $\beta$ 1. Изследването, чрез RT-PCR, показва понижаване на нивото на експресия на рецептора T $\beta$ RII. Подобни резултати са получени и в конвенционална двуизмерна култура, както и в първични човешки фибробласти в които е установена линейна дозозависима тенденция на понижаване на експресията на рецептора с повишаването на концентрацията на глюкоза.

Изследванията на материал от пациенти показва, че при страдащите от диабет нивата на експресия на T $\beta$ RII са понижени, докато при пациенти страдащи от синдром на диабетното стъпало напълно липсва експресия на рецептора в дермата, в близост до получената рана.

В опит да разбере причините за понижената експресия на T $\beta$ RII, дисертантът изследва RhoGTP-азата във фибробласти от дерма на здрави и диабетни плъхове. Независимо от трикратното повишение на активната форма на RhoGTP-азата в сравнение с контролните животно, резултатите от приложението на инхибитор на сигналната каскада водят до извода, че потиснатата експресия на T $\beta$ RII не е свързана с този тип сигнализация.

Най-сетне, изследван е ефекта на няколко епигенетични модулятора - инхибитори на ензимите предизвикващи репресивните хистонови модификации на хистон H3 - метилиране на лизинови остатъци 9 и 27, хистон-деацетилазни инхибитори, както и инхибитор на ДНК метилирането. Никои от инхибиторите не води до дерепресия на рецептора T $\beta$ RII. Същевременно, всички те, с изключение на инхибитора на H3K9 метилирането, повлияват положително на някакъв етап зарастването на рани в експерименталния модел. Подобен ефект има и инхибитора на RhoGTP-азата, което ясно показва, че изследванията с разработения модел на наранена дермална тъкан има много голям потенциал за бъдещи изследвания.

## Заклучение

Дисертацията на Александър Евангелатов прави отлично впечатление.

Литературния обзор е изчерпателен, целта и задачите са формулирани точно и ясно, а в частта материали и методи детайлно са описани множеството съвременни клетъчно- и молекулярно-биологични, микроскопски и др. методи използвани от автора. Получените резултати са коректно описани и интерпретирани в частта “Резултати и дискусия” и обобщени в изводите и приносите от дисертацията.

По темата на дисертацията има 3 публикации и 3 участия на научни форуми.

Получените резултати и приносите на дисертанта, както и публикациите му надхвърлят критериите на СУ за придобиване на степента “Доктор”.

Дисертацията е посветена на изключително актуален проблем и разкрива важен механизъм инхибиращ фибробластното активиране при висока концентрация на глюкоза. Разработения 3D модел на патологията диабетно стъпало има голям потенциал, включително за автоматизирани високопроизводителни скринингови изследвания на лекарствени средства. Изключително добро впечатление прави задълбоченото характеризирание на използвания модел и последователния логичен ход на изследване на ефекта на повишената концентрация на глюкоза върху фибробластното активиране и търсенето на причините за открития дефект на сигнализацията при тези условия. Това ясно демонстрира, че дисертанта е един отлично подготвен, в теоретично и практическо отношение, изследовател способен да проучва и разрешава сложни биологични проблеми.

Предвид казаното, убедено считам, че дисертационния труд заслужава най-висока оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Александър Викторов Евангелатов образователната и научна степен „Доктор“.

ПОДПИС: