

## **РЕЦЕНЗИЯ**

**на дисертационен труд на Александър Викторов Евангелатов**

**на тема: Фибробластно активиране в триизмерни, *in vivo* подобни условия,**

**за придобиване на научната и образователна степен „доктор“**

**Рецензент: доц. д-р Румяна Цонева**

### **Актуалност и значимост на темата**

Синдромът на диабетно стъпало е много тежко и все по-често срещано усложнение при пациенти със захарен диабет с кумулативна честота и се проявява до 25 % от болните. Основна характеристика на заболяването е нарушения процес на миофибробластна диференциация. Настоящият дисертационен труд представя експериментален модел за *in vitro* изследване на синдромът на диабетното стъпало, базиран на нативна *in vivo*-подобна 3Д култура от фибробласти, чрез който се изследват механизмите, водещи до нарушено фибробластно активиране.

### **Структура на дисертационния труд**

Дисертационния труд е написан на 111 страници. Основните раздели са: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Цитирана литература. Тези основни раздели са предшествани от Съдържание и Използвани съкращения. Следва да се отбележи, че липсва номерация в хартиеното копие на дисертационния труд.

**Литературният обзор** е на 41 страници. В него подробно са описани структурните елементи на кожата, както и нейната функция по време на ембрионалното развитие и за поддържане на хомеостазата при възрастни. Особено внимание в обзора е отделено на фибробластите като основните клетки на дермалната съединителна тъкан и тяхната роля за синтеза, структурирането и ремоделирането на извънклетъчния матрикс (ИКМ) отговорен за функциите на тъканта. Подробно е описано фибробластното активиране и неговата роля при процеси в норма и патология. Активните фибробласти участват в

процеса на заздравяване на рани, както и във фиброзните разраствания и капсули при фибропролиферативни заболявания, в това число и при процеса на канцерогенезата. Разгледана е нарушената координация на фибробластното активиране водеща до различни патологии като фибропролиферативните заболявания (хиперпролиферация, цироза, инфаркт на миокарда, белодробни инфекции и др.) или като диабет (намалена пролиферация) и свързания с него процес на трудно зарастващи рани. Поставен е въпроса за намиране на успешни терапии регулиращи фибробластното активиране, като за тази цел се изисква детайлно познаване на клетъчните и молекулните механизми, които го управляват. Разгледани са факторите отговорни за функционалното състояние на фибробластите като паракринната хуморална сигнализация от редица растежни фактори (TGF $\beta$ 1, CTGF, EGF, FGF и др.) и инфламаторни цитокини (IL1, IL6 и др.), както и структурата и механичните характеристики на ИКМ. Поставен е въпросът за създаване на *in vivo* - подобна система за изучаване на влиянието на ИКМ върху фибробластното активиране. Подробно е разгледана ролята и структурата (градивни белтъци) на ИКМ. Отделено е основно внимание на ролята на TGF  $\beta$  сигнализацията, TGF  $\beta$  секрецията и извънклетъчната ѝ организация при миофибробластна диференциация при процеси свързани със зарастване на рани, както и при развитие на фибропролиферативни заболявания.

Голямо внимание е отделено на етимологията и класификацията на диабета като едно от значимите съвременни заболявания, както и описанието на едно от основните усложнения при пациенти с диабет - развитие на диабетно стъпало. При много пациенти се налага прилагане на терапии за подмяна на кожата чрез автоложна трансплантация на кожа или чрез използване на метода на тъканното инженерство и използването на човешки кожни еквиваленти, като по този начин се цели да се спре развитието на патологията и ампутация на засегнатия крайник. Проследен е както физиологичния процес на зарастване на рани, така и патологията при трудно зарастващи рани и ролята на ИКМ, растежните фактори и цитокините в тези процеси. Описани са както и стандартни методите за лечение на диабетните рани, така и иновативни методи като лечение с растежни фактори, използването на автоложни присадки, тканно-инженерни еквиваленти на кожа базирани на различни компоненти на ИКМ или третиране със стволови клетки.

Основно внимание е отделено на триизмерните клетъчни култури като важна възможност за създаване на клетъчна среда наподобяваща нативната в организма и

ролята, която те могат да играят при изучаване на молекулните механизми на различни патологични състояния. Подробно са описани видовете триизмерни системи за клетъчно култивиране базирани на изкуствени материали и естествени компоненти от ИКМ, като са изтъкнати предимствата и недостатъците им. Изтъкнати са предимствата на нативната триизмерна култура получена от екипа, в който участва докторанта, и продуцирания от нея матрикс като модел на 3Д система. Сред предимства на тази 3Д система могат да се посочат механичните свойства наподобяващи нативните тъкани, повишено ниво на белтъчен синтез, засилена пролиферативна активност чрез промяна на клетъчната сигнализация и намален оксидативен стрес, които я доближават по структура и свойства на дермална тъкан *in vivo*.

Разделът е подходящо илюстриран с 7 схеми и 2 таблици. На базата на описаната нативната триизмерна култура от GD25β1 фибробласт-подобни клетки е проучена възможността за активирането на фибробластните клетки в нея и приложението ѝ за изследване на процесите на зарастване на рани.

Като цяло литературният обзор е много обширен и обхваща всестранно молекулните аспекти на фибробластно активиране, формирането и реорганизацията на извънклетъчен матрикс, както и съвременните подходи при използването на 3Д ситеми за клетъчно култивиране.

### **Цел и задачи**

Целта на дисертационния труд е изследване на миофибробластната диференциация в триизмерни *in vivo*-подобни условия и патологичните промени настъпващи при язви предизвикани от синдрома на диабетното стъпало. Целта включва и разработване модел на патологията, базиран на описана от екипа нативна триизмерна *in vitro* система за клетъчно култивиране, която се доближава във висока степен до здрава тъкан.

На базата на основната цел са формулирани **четири задачи**, включващи:

1. Изследване на приложимостта на моделната *in vivo* - подобна система за проучване на сигнализацията регулираща фибробластната диференциация.
2. Разработване на експериментален подход за активиране на фибробластите, култивирани в триизмерна среда чрез механично нараняване.

3. Изследване и определяне сходствата и различията в клетъчната сигнализация на фибробласти, култивирани в триизмерна среда, в условия, характерни за здрава тъкан и в патология. Съпоставяне с конвенционална монослойна култура.

4. Експериментално манипулиране на избрани молекулярно-биологични сигнални каскади с цел индуциране на миофибробластна диференциация в условия характерни за синдрома на диабетното стъпало.

Целта на работата е правилно формулирана и определя ясно областите, в които ще бъде проведено изследването. Така поставените задачи съответстват с общата цел на дисертацията и са предпоставка за нейното постигане.

### **Материали и методи**

Разделът е на осем страници и включва описание на използваните клетъчни култури, реагенти и антитела, както и описанието на използваните процедури и методи и използваната статистическа програма за анализ на резултатите. За пълнотата на описаните методики допринася включването на една схема и една таблица. Описанието на раздела е достатъчно пълно и изчерпателно, за да могат да бъдат възпроизведени предвидените експерименти.

### **Резултати и дискусия**

Разделът е написан на 38 страници и съдържа 31 фигури и 1 схема. В началото на раздела са показани данните от характеризирането на ИКМ продуциран от GD25 $\beta$ 1 фибробласти при формиране на нативна триизмерна култура, като нивото на експресия на основни белтъчни компоненти, тяхното разпределение в ИКМ и клетъчната морфология. Получените резултати потвърждават тезата, че използваната триизмерна култура се доближава до нормална тъкан по отношение на разпределението на основните белтъчни компоненти на извънклетъчния матрикс и придобиване на *in vivo*-подобна вретеновидна морфология на фибробластите и формиране на 3Д матриксни адхезии. Разработената *in vitro* модел на система на наранена дермална тъкан е използвана за изследване на процесите на зарастване на рани свързани със синдрома на диабетното стъпало. В тази връзка е изследвана TGF $\beta$ 1-зависимата сигнализация като важен фактор за фибробластната активация и последваща диференциация. Получените данни сочат, че използваните нативни триизмерни култури, освен характерна за дермата структура и състав на ИКМ, се намират и в неактивно състояние.

Към нативните триизмерни култури е приложена разработена методика за експериментално нараняване. Резултатите сочат, че бързината на заздравяване на експерименталните рани е в пряка зависимост от концентрацията на глюкоза в средата, като рани с висока концентрация на глюкоза заздравяват сравнително по-бавно. Количеството на гладкомускулен актин ( $\alpha$ SMA) е завишено при фибробласти отглеждани в среда с ниска глюкоза за разлика от фибробластни култури отглеждани в среда с висока концентрация на глюкоза. Все пак е установено, че механичното нараняване не е достатъчен стимул за предизвикване на миофибробластна диференциация и активиране на триизмерните култури. Проведено е активиране на триизмерните нативни култури посредством TGF $\beta$ 1 в среда с ниска и висока концентрация на глюкоза. Данните сочат статистически значимо повишаване на експресията на гладкомускулен  $\alpha$ -актин, маркерът за миофибробластна диференциация, в триизмерни култури отглеждани в среда с ниска концентрация на глюкоза при повишаване концентрацията на TGF $\beta$ 1, докато в среда на висока концентрация на глюкоза не се наблюдава повишаване на количеството на  $\alpha$ SMA, дори и при третиране с високи концентрации на TGF $\beta$ 1. Предложена е хипотеза защитаваща схващането, че култивирането в условия на висока концентрация на глюкоза води до нарушаване на вътреклетъчната сигнализация. В потвърждение на тази хипотеза са експерименталните данни показващи, че третирането със Smad2/3 белтъци (основни медиатори на TGF $\beta$ 1-зависимата клетъчна сигнализация) на фибробласти култивирани в среда с висока концентрация на глюкоза не води до активиране на фибробластите, което означава, че при висока концентрация на глюкоза в средата TGF $\beta$ 1-зависимата сигнализация не се осъществява по Smad-сигналната каскада. Така получените резултати ясно показват, че триизмерни култури от GD25 $\beta$ 1 фибробласти отглеждани в среда с висока концентрация на глюкоза не могат да бъдат активирани нито посредством механични сигнали – чрез експериментално нараняване, нито посредством растежния фактор TGF $\beta$ 1. На база на тези резултати, е допусната възможността за влияние на високата доза глюкоза върху нивата на експресия на рецепторите за този растежен фактор. Получените резултати показват значимо понижаване на експресията на рецептор тип 2 за трансформиращ растежен фактор  $\beta$ 1 (T $\beta$ RII) при високи нива на глюкоза, но в същото време експресията на рецептор тип 1 за трансформиращия растежен фактор  $\beta$ 1 (T $\beta$ RI) не се повлиява. Тези резултати се потвърждават и при отглеждането на GD25 $\beta$ 1 фибробласти при конвенционални, монослойни условия, както и при човешки фибробласти, което доказва че феноменът не е клетъчно специфичен.

По-нататък авторът на дисертацията изследва експресията на рецептор тип 2 за TGF $\beta$ 1 при пациенти страдащи от диабет и синдром на диабетното стъпало. Резултатите от предоставените за анализ проби показват същата тенденция на намаляване на експресията на T $\beta$ RII както при нативните клетъчни култури, при пациенти страдащи от диабет и синдрома на диабетното стъпало.

Чрез използване на модел за индуциране на диабет при опитни животни е изследвана активността на RhoGTP-азата във фибробласти от дерма на здрави и диабетни животни с помощта на специфичен ELISA-базиран кит за определяне на активната форма на RhoGTP-азата. Резултатите показват трикратно повишена активност на RhoGTP-азата при диабетни животни, което напълно корелира с получените резултати за GD25 $\beta$ 1 фибробласти отглеждани като триизмерна култура в среда с висока и в среда с ниска концентрация на глюкоза, условия имитиращи норма и патологична хипергликемия при диабет. Изследвани са и епигенетични модификации влияещи на експресията на T $\beta$ RII и активирането на фибробласти. При това изследване са използвани няколко подхода за маниполиране на хистоновите белтъци: ацетилиране на хистоновите белтъци, инхибиране триметилирането на лизинов остатък на хистон H3, инхибиране на диметилирането в лизинов остатък 9 на хистон 3 и инхибиране на свръхметириране в определени промоторни региони на гена за T $\beta$ RII. Получените резултати след третиране на първични човешки фибробласти за 24ч. със съответните инхибитори не показват възстановяване на експресията на рецептор тип 2 за TGF $\beta$ 1. Използваните вещества за повлияване на епигенетичните характеристики на нативна триизмерна култура от GD25 $\beta$ 1 фибробласти са тествани и при зарастването на експериментално предизвикани рани. Получените резултати показват, че инхибиране на хистондеацетилази посредством трихостатин А води до по-бързо зарастване на експериментално предизвиканите рани през първите дни след нараняването, но за разлика от инхибирането на RhoGTP сигналната каскада не води до значимо намаляване на размера на раните в края на изследвания период, а именно 7 дни след нараняване. TSA, за разлика от VA, води до инхибиране на HDAC6, което предизвиква ацетилиране на тубулина и индуцира клетъчна миграция, на което най-вероятно се дължи и ускореното зарастване на рани след нараняване. Инхибиране на диметилирането в лизинов остатък 9 на хистон 3 (H3K9me2) не повлиява скоростта на зарастване на рани. Блокиране на ДНК метилирането също води до по-бързо зарастване на експериментално предизвиканите рани през първите дни след нараняването, но отново

не води до значимо намаляване на размера на раните в края на изследвания период.

**Получени са следните по-важни резултати:**

1. Използваната моделна нативната триизмерна култура от GD25 $\beta$ 1 фибробласти притежава характерната за здрава дермална тъкан структура и композиция на ИКМ. Този метод на култивиране предизвиква *in vivo*-подобна вретеновидна морфология на фибробластите в нативната триизмерна култура и формиране на 3Д матриксни адхезии.
2. Триизмерни култури от GD25 $\beta$ 1 фибробласти отглеждани в среда с висока концентрация на глюкоза не могат да бъдат активирани нито посредством механични сигнали – чрез експериментално нараняване, нито посредством растежния фактор TGF $\beta$ 1.
3. За пръв път е показана причината за нарушена TGF $\beta$  сигнализация във фибробласти от диабетни рани като наблюдаваното подтискане на експресията на рецептор тип 2 за TGF $\beta$ 1 е в резултат от въздействието на сигнали от RhoGTP сигналната каскада и/или епигенетични модификации в хистоновите белтъци или в ДНК молекулата.
4. Предоставените за анализ проби от пациенти нестрадащи от диабет показват значителна вариация в експресия на T $\beta$ RII. При пациенти страдащи 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.

Оформлението на раздела е на високо ниво. Стилът на писане е стегнат, добре обоснован и структуриран. Графично представяните данни са добре организирани и са с достатъчно описание към тях. Показани са резултати от всички изследвания, коментирани в текста на раздела. Данните са правилно интерпретирани. Обсъждането в дискуссионната част на раздела е на високо ниво и е подплатено с използването на множество съвременни цитати. Получените данни и направените изводи са разглеждани в светлината на съвременните изследвания в областта, за което свидетелства големият брой цитирани публикации в хода на обсъждането.

## **Изводи**

На базата на извършените изследвания са направени 6 извода, които са на базата на получените резултати:

- 1.** При преминаване от двуизмерни в триизмерни условия с формирането на нативната триизмерна култура от GD25 $\beta$ 1 фибробласти не се наблюдава промяна в профила на синтезираните компоненти на извънклетъчният матрикс. Формираният матрикс се доближава по състав и структура до здрава дермална тъкан и води до придобиване на *in vivo*-подобна морфология на фибробластите.
- 2.** Култивиране на фибробласти в условия на хипергликемия води до нарушаване на вътреклетъчната сигнализация и невъзможност за индуциране на миофибробластна диференциация чрез стимулиране с трансформиращ растежен фактор  $\beta$ 1.
- 3.** Култивиране на фибробласти в условия на хипергликемия води до потискане на експресията на рецептор тип2 за трансформиращ растежен фактор  $\beta$ 1, но не оказва влияние върху нивата на рецептор тип1.
- 4.** Условия на хипергликемия предизвикват повишаване на активността на RhoGTP-азата *in vivo* и *in vitro*. Инхибиране на Rho сигналната каскада предизвиква ускорено зарастване на рани в експерименталният модел на синдром на диабетното стъпало, но не и до възстановяване на експресията на рецептор тип 2 за трансформиращ растежен фактор  $\beta$  и индуциране на миофибробластна диференциация.
- 5.** Инхибиране на хистондеацетилази от клас I и клас II в условия на хипергликемия не води до възстановяване на експресията на рецептор тип2 за трансформиращ растежен фактор  $\beta$ , но ускорява зарастване на рани в първоначалните етапи в експерименталният модел на синдром на диабетното стъпало и индуцира миофибробластна диференциация.

## **Приноси**

**Показани са три основни приноса.** Според мен те са правилно формулирани, отговарят на получените експериментални данни и напълно потвърждават работните хипотези. Лично за мен основният принос на работата е свързан с разкриване на



молекулните механизми на диабета свързани със заимовръзката между високите нива на глюкоза и потискане експресията на рецептор 2 за трансформиращия растежен фактор  $\beta 1$ . Така разработената *in vitro* система за изследване на зарастването на рани успешно би могла да бъде използвана за тестове на лекарствени препарати в *in vivo*-подобни условия, което би доближило получените резултати до тези в *in vivo* условия и клинични изпитания.

## **Литература**

Цитирани са 219 литературни източника, основната част от които е публикувана след 2000 г. Литературните източници са правилно цитирани и оформени. Дисертационната е написана граматически правилно и е пунктуационно издържана. В дисертацията са допуснати дребни технически грешки, но по-съществени забележки нямам.

## **Автореферат**

Авторефератът съдържа 45 страници и включва 28 фигури и 1 схема и съответства по съдържание на дисертацията. Той е правилно структуриран и дава ясна представа за съществените моменти в дисертацията. Посочени са всички основни резултати, получени в хода на изследванията. Направено е много добро обобщение на данните.

## **Публикации във връзка с дисертацията**

Публикувани са 2 статии с импакт-фактор и една глава от книга. Забелязан е един цитат на една от публикациите. Докторантът има и три участия в научни форуми. Тези публикации покриват изискванията за присъждането на степента „доктор“.

## **Заклучение:**

Считам, че дисертационният труд на Александър Викторов Евангелатов е едно задълбочено и съвременно изследване на молекулните механизми на фибробластното активиране при патологични състояния като усложнения при диабета и дава възможност за развитие на научните изследвания в една перспективна област каквато е тъканното инженерство и регенеративната медицина чрез разработения и приложен *in vivo*-подобен 3Д клетъчен модел.

Въз основа на гореизложеното считам, че настоящият дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България,

Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България, както и на Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски” и уверено препоръчвам на Научното жури да присъди на Александър Викторов Евангелатов образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3 Биологически науки (Клетъчна биология)

10.03.2015

Рецензент:

София

/доц. д-р Румяна Цонева/