

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО ОФТАЛМОЛОГИЯ**

---

**Д-Р ВАСИЛ МАРКОВИЧ ХАЙКИН**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**  
**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН**  
**„ДОКТОР“**

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“, шифър 7.1

Научна специалност „Офталмология“, шифър 03.01.36

на тема

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПЪРВИЧНИ ЧОВЕШКИ КЛЕТЪЧНИ**  
**КУЛТУРИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ПРЕДНИ ЛЕЩЕНИ КАПСУЛИ НА**  
**ПАЦИЕНТИ С КАТАРАКТА**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р АЛЕКСАНДЪР ХУГО ОСКАР, ДМ**

**НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: ГЛ. АС. АНТОНИЯ РУМЕНОВА ИСАЕВА, ДБ\***

**\*КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ, МФ, МУ - СОФИЯ**

**СОФИЯ, 2021**

*Дисертационният труд съдържа 74 стандартни машинописни страници. За неговото онагледяване са използвани 3 таблици и 18 фигури. Библиографската справка обхваща 125 източника, от които 9 на кирилица и 116 на латиница.*

*Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Офталмология при Медицински университет - София, проведен на 23.02.2021 г.*

*Публичната защита на дисертационната работа ще се проведе на 27.05.2021 г. от 13.00 ч. в аудиторията на Клиника по нервни болести – УМБАЛ „Александровска“, ул. „Св. Георги Софийски“ №1, гр. София, при спазване на противоепидемичните мерки.*

*Публичната защита ще бъде проведена дистанционно, в случай че епидемичната обстановка не позволява присъствено провеждане.*

*Научно жури в състав:*

- 1. Проф. д-р Ива Тодорова Петкова-Георгиева, дм*
- 2. Доц. д-р Станислава Костова Иванова, дм*
- 3. Проф. д-р Лъчезар Георгиев Войнов, дм*
- 4. Проф. д-р Мариета Иванова Конарева-Костянева, дм*
- 5. Доц. д-р Атанас Димитров Калайджиев, дм*

*Резервни членове:*

- 1. Проф. д-р Цветомир Иванов Димитров, дм*
- 2. Доц. д-р Наталия Христова Петкова, дм*

*Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински университет – София.*

*Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.*

## Съдържание

<b>СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ:</b> .....	<b>4</b>
<b>СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ:</b> .....	<b>5</b>
<b>СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА:</b> .....	<b>6</b>
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>7</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>8</b>
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b> .....	<b>9</b>
1. <i>Клиничен материал</i> .....	9
2. <i>Лабораторни консумативи, реактиви и материали</i> .....	10
3. <i>Методи на изследване</i> .....	11
<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>13</b>
1. <i>Изследване на миграционната активност на ЛЕК</i> .....	13
2. <i>Изследване на пролиферативната и клоногенната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури</i> .....	15
3. <i>Фазово-контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК</i> .....	19
4. <i>Изследване на участието на протеин киназа CK2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК</i> .....	22
5. <i>Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларният матрикс на първични клетъчни култури</i> .....	23
<b>ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	<b>27</b>
<b>ИЗВОДИ</b> .....	<b>31</b>
<b>ПРИНОСИ</b> .....	<b>32</b>
<b>СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	<b>33</b>
<b>СПИСЪК С УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	<b>34</b>
<b>СПИСЪК С НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	<b>35</b>

**Списък на таблиците:**

ТАБЛИЦА 1. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИ ПО ВИД КАТАРАКТА, ПОЛ И ВЪЗРАСТ. ....	9
ТАБЛИЦА 2. БРОЙ ЕКСПЛАНТИ И ВИД ОБАГРЯНЕ.....	10
ТАБЛИЦА 3. КОЛОНИОФОРМИРАНЕ .....	17

## Списък на фигурите:

ФИГУРА 1. ПЪРВИЧНИ ЛЕК КУЛТУРИ.....	14
ФИГУРА 2. КОЛОНИОФОРМИРАНЕ .....	16
ФИГУРА 3. МУЛТИФЛУОРЕСЦЕНТНА МИКРОСКОПИЯ .....	18
ФИГУРА 4. ФАЗОВО – КОНТРАСТЕН И ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН АНАЛИЗ НА ЛЕК .....	20
ФИГУРА 5. ОБОБЩЕН ФАЗОВО – КОНТРАСТЕН И ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН АНАЛИЗ НА ЛЕК .....	21
ФИГУРА 6. АКТИВНОСТ НА ERK 1/2 (%) ПРИ 24-ЧАСОВОТО ТРЕТИРАНЕ НА ЛЕК С TGF- $\beta$ 2 .....	22
ФИГУРА 7. АКТИВНОСТ НА СК2 (%) ПРИ 12-ЧАСОВОТО siRNA-МЕДИИРАНО ЗАГЛУШАВАНЕ НА ЕНДОГЕННАТА КАТАЛИТИЧНА СУБЕДИНИЦА (A) НА ПРОТЕИН КИНАЗА СК2 .....	23
ФИГУРА 8. ТРОЙНО ФЛУОРЕСЦЕНТНО МАРКИРАНЕ НА ЖИВИ ЛЕК. ....	24
ФИГУРА 9. ОТНОСИТЕЛНИ НИВА НА ВЪТРЕКЛЕТЪЧНИЯ ОКСИДАТИВЕН СТРЕС (ROS) И НА КАЛЦИФИКАЦИЯТА НА ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИЯ МАТРИКС (CA <sup>2+</sup> ) НА ЖИВИ ЛЕК .....	26

**Списък на съкращенията:**

АТФ - аденозин трифосфат

ВК - вторична катаракта

ВОЛ - Вътреочна леща

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ЗД2 - Захарен диабет тип 2

ЕМП – епително-мезенхимен преход

ЛЕК - лещени епителни клетки

ПЛК - предна лещена капсула

BrdU - Bromodeoxyuridine

DAPI – Diamidino phenylindole

DCFDA - Dichlorofluorescein diacetate

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF - epithelial growth factor

ERK 1/ 2 - Extracellular regulator kinases 1 and 2

FBS – fetal bovine serum

FGF - 2 - fibroblast growth factor 2

FOXM1- Forkhead box protein M1

IL-1 - interleukin 1

IL-6 - interleukin 6

PBS - Phosphate - buffered saline

ROS - reactive oxygen species

RNS - reactive nitrogen species

$\alpha$ -SMA -  $\alpha$ -Smooth Muscle actin

TB - Trypan blue

TGF- $\beta$  - transforming growth factor- $\beta$

XO – xylenol orange

## Въведение

Възрастово обусловената катаракта е едно от най-честите заболявания сред хората над 50 годишна възраст (1,2). Тя е водеща причина за обратима слепота в света с над 17 000 000 ослепели (3). Катаракталната екстракция с имплантация на вътреочна леща е най-успешната и най-често извършвана оперативна интервенция в медицината, като се очаква да достигне до 30 милиона годишно. Факоемулсификацията се характеризира с по-слабо изразено постоперативно възпаление и по-ниска вероятност за образуване на вторична катаракта, спрямо останалите оперативни техники (2,4–6).

Захарният диабет тип 2 е неинфекциозно епидемично (социално значимо) заболяване с постоянно нарастващ брой болни, като се очаква диабетно болните до 2030 год. да достигнат 439 милиона. Катарактата е водеща причина за намалено зрение при пациентите с диабет, като нейната честота сред тях е по-висока в сравнение с недиабетно болните (7).

Уплътнението и помътняването на задната лещена капсула, известно като „вторична катаракта“ (ВК), е най-честото дългосрочно усложнение на катаракталната хирургия (8–11). Съвременните хирургични техники, материали и дизайн на вътреочните лещи (ВОЛ) водят до намаляване на честотата на ВК. Въпреки това, тя остава значим проблем при 20 до 40% от пациентите за периода от 2 до 5 години след катаракталната хирургия (8). Наблюдава се повишаване на честотата ѝ с намаляване на възрастта на пациентите, като в педиатричната група достига до 100% (12,13).

Единственият доказал се метод за лечение на ВК е Nd:YAG лазер капсулотомията, който от своя страна се свързва с усложнения, като отлепване на ретината, увреждане на ВОЛ, кистоиден макулен едем, повишено вътреочно налягане, ирисова хеморагия, оток на роговицата, сублуксация на ВОЛ и екзацербация на ендофталмит (8).

Задълбоченото изучаване на физиологията на лещено епителните клетки е от изключително значение за установяване на патогенетичните механизми, водещи до образуване на възрастово обусловените и на вторичните катаракти, както и за намаляване на тяхната честота и постигане на дългосрочен положителен ефект от хирургичното лечение. Това е първото по рода си изследване в България, в което се култивират и изследват първични човешки лещено епителни клетки от недиабетно и диабетно болни пациенти с възрастово обусловена катаракта.

## Цел и задачи

### Цел:

Изолиране и поддържане на първични човешки лещено епителни клетки от експланти от предна лещена капсула при стандартна факоемулсификация, със или без интраоперативно използване на *trypan blue*, при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта и изследване и сравнение на основните им клетъчно-физиологични характеристики: миграционна, пролиферативна и диференциационна активности, нивата на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларния им матрикс.

### Задачи:

1. Получаване на експлант от предна лещена капсула чрез капсулорексис, със или без интраоперативно използване на *trypan blue*, на пациенти с възрастово обусловена катаракта и на пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
2. Получаване на първични ЛЕК от предна лещена капсула.
3. Изследване на миграционната активност на ЛЕК при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
4. Изследване на клоногенната активност на ЛЕК при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
5. Изследване на пролиферативната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
6. Изследване на участието на протеин киназа CK2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК.
7. Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларния матрикс на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.

## Материал и методи

### 1. Клиничен материал

#### 1.1. Брой и разпределение на пациентите по групи:

Събирането на пациентски експлантати бе проведено след получаване на одобрение от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет - София.

Обагрени с *trypan blue* 0,06% и необагрени кръгови експлантати (с диаметър около 5 мм) от предна лещена капсула с прилежащите ѝ лещно епителни клетки (ЛЕК) бяха получени при преден кривилинеарен капсулорексис на 176 пациенти (възраст 50 - 93 години;) 148 пациента с възрастово обусловена катаракта и 28 пациента с катаракта вследствие на захарен диабет тип 2 (ЗД2), дали информирано съгласие и подложени на оперативно лечение на катаракта в Клиниката по очни болести при УМБАЛ „Александровска” ЕАД (

Таблица 1). Един от пациентите бе с поставена диагноза карцином на дебелото черво.

Вид катаракта	Жени	Мъже	Общо	Средна възраст	Медиана	Обхват	Процент (%)
Възрастово обусловена	87	61	148	71,74	73,00	50 - 93	84,09
Диабет тип 2 - индуцирана	9	19	28	65,89	66,00	50 - 83	15,91
Общо	96	80	176	70,81	73,00	50 - 93	100,00
Средна възраст	71,74	72,00	70,81				
Медиана	72,00	69,00	73,00				
Обхват	50 - 88	50 - 93	50 - 93				
Процент (%)	54,55	45,45	100,00				

Таблица 1. Разпределение на пациенти по вид катаракта, пол и възраст.

Бе избрана репрезентативна извадка от 17 експлантати от пациенти с възрастово обусловена катаракта (възраст 55 - 75 год.) и 16 пациенти със ЗД2. Интравитално обагряне с *trypan blue* 0,06% бе направено при 19 пациенти. Суправитално (*iv vitro* от двете страни) бяха обагрени 10 експлантати и 8 експлантати не бяха обагрени (Таблица 2).

Пациенти	<i>Trypan blue</i> 0.06% обагрени експланти		Необагрени експланти
	Еднострaнно	Двустрaнно	
Недиабетици	10	3	4
Диабетици	9	3	4

**Таблица 2. Брой експланти и вид обагряне.**

## **2. Лабораторни консумативи, реактиви и материали**

- Багрило за преден очен сегмент Tekno Capsule Blue 0,06% *Trypan blue* , стерилен разтвор (Teknomek, Turkey)
- 75 cm<sup>2</sup> културални матраци, мулти ямкови (12 и 96) културални плаки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)
- Пълноценна хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
- fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA)
- trypsin/EDTA (Gibco, Germany)
- Phosphate - buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium)
- 1 vol acetic acid/ 7 vol methanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Crystal violet solution (crystal violet powder/H<sub>2</sub>O/ methanol, Sigma-Aldrich, USA)
- Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU, Santa Cruz Biotecnology, USA)
- блокиращ буфер (PBS, 3% BSA, 0,02% Tween20)
- TrytonX-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Paraformaldehyde
- Hechst 3342 (Santa Cruz Biotech, USA)
- 4',6-diamidino-2-phenylindole ( DAPI, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Човешки, рекомбинантен растежен фактор TGFβ2
- Scrambled siRNA, CK2α siRNA (Santa Cruz Biotecnology, USA)
- Si RNA Reagent System (Santa Cruz Biotecnology, USA)
- комплексен трансфекционен кит (siRNA Reagent System, Santa Cruz Biotecnology, USA)
- Xylenol Orange ( XO, Sigma-Aldrich, USA)
- 2',7'- Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich, USA)

- Първични антитела
  - Anti-human BrdU antibody (sc-51514) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - Anti-human FOXM1 antibody (sc-271746) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - Anti-N-cadherin antibody (sc-59987) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - Anti-Vimentin antibody (sc-373717) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - Phospho-ERK1/2 (Thr202, Tyr204), rabbit antibody (Sigma-Aldrich, USA)
  - Anti-human CK2 $\alpha$  antibody (Sigma-Aldrich, USA)
  - Anti-human  $\alpha$ SMA antibody (Sigma-Aldrich, USA)
  
- Вторични имунофлуоресцентно белязани антитела
  - chicken anti-rabbit IgG-FITC antibody (sc-2990) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - goat anti-mouse IgG-CFL 555 antibody (sc-362267) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - goat anti-mouse IgG-CFL 488 antibody (sc-362257) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
  - donkey anti-goat IgG-CFL 647 antibody (sc-362285) (Santa Cruz Biotechnology, USA)

### 3. Методи на изследване

- 3.1. Получаване на експлант от човешка леща в хода на стандартна факоемулсификация, с или без интраоперативно използване на *trypan blue* за визуализация на предната лещена капсула, от пациенти с възрастово обусловена катаракта и пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. Използвана е техниката на оцветяване на предна лещена капсула с *trypan blue* 0,06%.
- 3.2. Суправитално обагряне на експлантите– допълнителна експозиция на ПЛК с *trypan blue* 0,06% за 1 мин. с последващо промиване с физиологичен разтвор.
- 3.3. Получаване на първични ЛЕК от предна лещена капсула.
- 3.4. Пасажиране на ЛЕК култури.
- 3.5. Фазово-контрастно светлинно микроскопско наблюдение на ЛЕК.
- 3.6. Цитохимично белязване на първични ЛЕК с Crystal violet.
- 3.7. Белязване с 5-bromodeoxyuridine (BrdU) на първични ЛЕК.
- 3.8. Имунофлуоресцентно маркиране на BrdU-белязаните първични ЛЕК.

- 3.9. Имунофлуоресцентно беляване срещу Vimentin и N-cadherin.
- 3.10. Стимулация с TGF $\beta$ 2.
- 3.11. siRNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) на протеин киназа CK2 в TGF $\beta$ 2-стимулираните ЛЕК.
- 3.12. Имунофлуоресцентно беляване срещу ERK1/2, CK2 $\alpha$ , vimentin и  $\alpha$ SMA на TGF $\beta$ 2-стимулирани, scrambled siRNA/CK2 $\alpha$  siRNA-трансфектираните ЛЕК.
- 3.13. Флуорисцентно оцветяване на живи първични ЛЕК с xylene orange, визуализиращ калциев депозит в екстрацелуларния матрикс и флуорисцентно оцветяване на живи първични ЛЕК с 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, визуализиращ вътреклетъчния оксидативен стрес (ROS).
- 3.14. Микроскопски анализи (Image-based high content screening) на цитохимична и мултифлуорисцентна микроскопия.
- 3.15. Статистически анализ.

Получените данни от Image-Based High Content Screening анализите бяха анализирани чрез Student's test и One-way ANOVA, проведени на SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA). P<0.05 (\*) беше прието за статистически значима достоверност, а P<0.01 (\*\*) за високо значима достоверност.

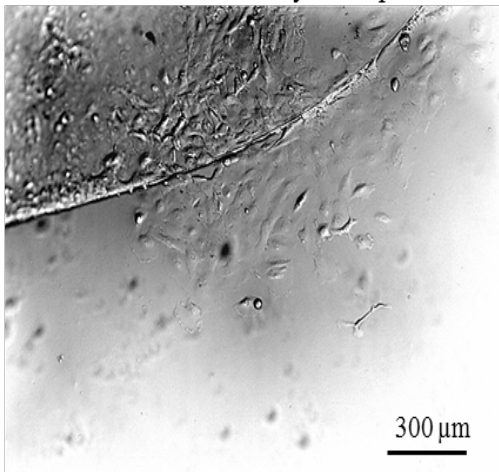
## Резултати

1. **Изследване на миграционната активност на ЛЕК** при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.

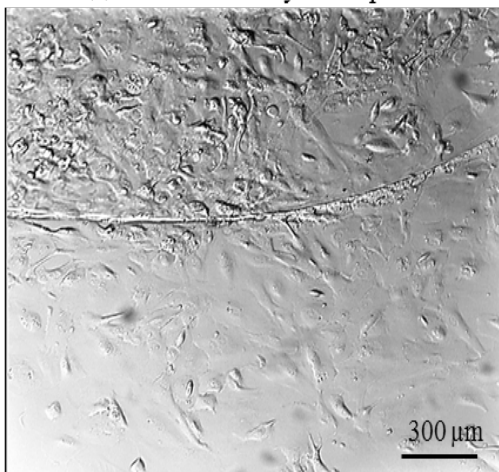
Мигриране на първични ЛЕК бе наблюдавано от всички експланти. Латентния период (lag фаза), след който започва миграцията, беше различен при ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта със ЗД2 и ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта без диабет (Фигура 1). При експлантите от пациенти с възрастово обусловена катаракта миграция на първите клетки (т. нар. *leader cells*) бе установена на 5-7 ден (mean=5,875, n=8) от *in vitro* култивирането. При експлантите от пациенти със ЗД2 индуцирана катаракта миграция започва на 8-10 ден (mean=8,875, n=8) от *in vitro* култивирането. Не бяха установени разлики в латентния период на *in vivo trypan blue* обагрени и необагрените експланти от двете пациентски групи.

LECs култура, изолирани от антериорна лещна капсула от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта

10-ти ден от *in vitro* култивирането

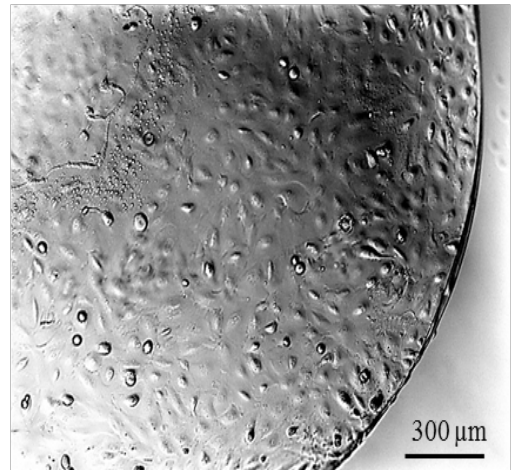


15-ти ден от *in vitro* култивирането

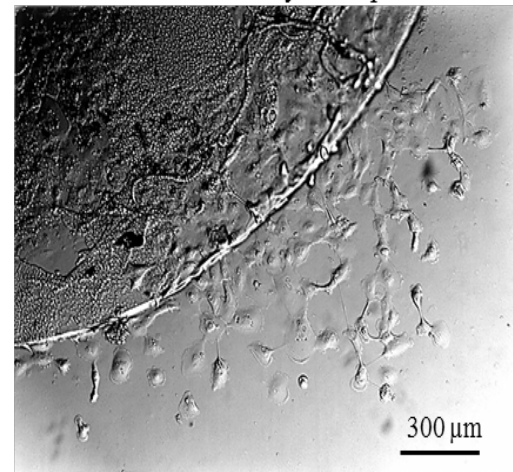


LECs култура, изолирани от антериорна лещна капсула от пациенти с възрастообусловена катаракта

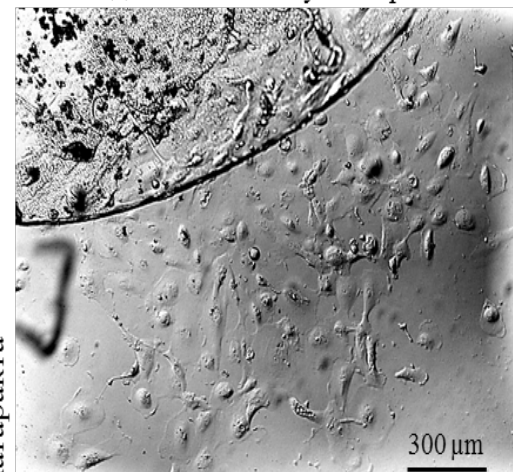
2-ри ден от *in vitro* култивирането



6-ти ден от *in vitro* култивирането



10-ти ден от *in vitro* култивирането



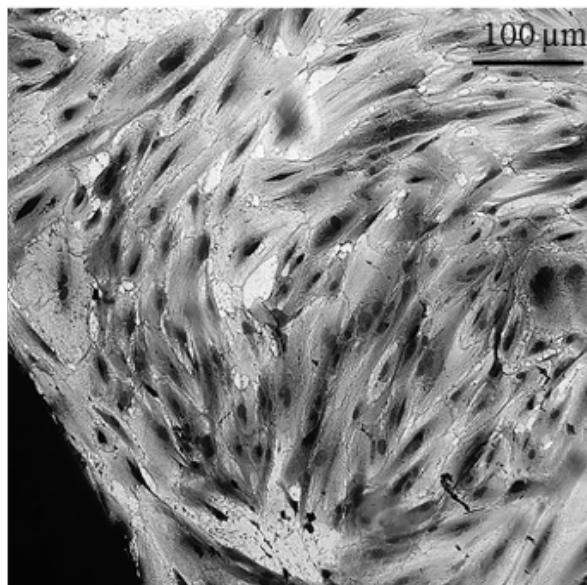
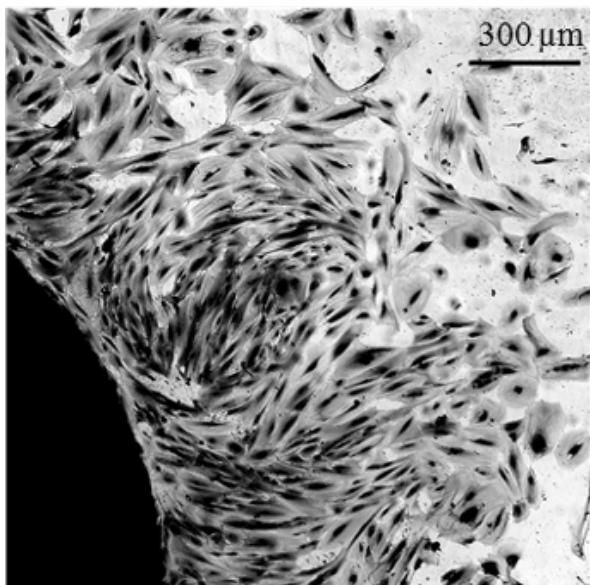
**Фигура 1. Първични ЛЕК култури:** при експлантите от пациенти с възрастово обусловена катаракта миграция на първите клетки бе установена на около 6 ден от *in vitro* култивирането. При експлантите от пациенти със ЗД2 индуцирана катаракта миграцията започва на около 9 ден от *in vitro* култивирането.

**2. Изследване на пролиферативната и клоногенната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.**

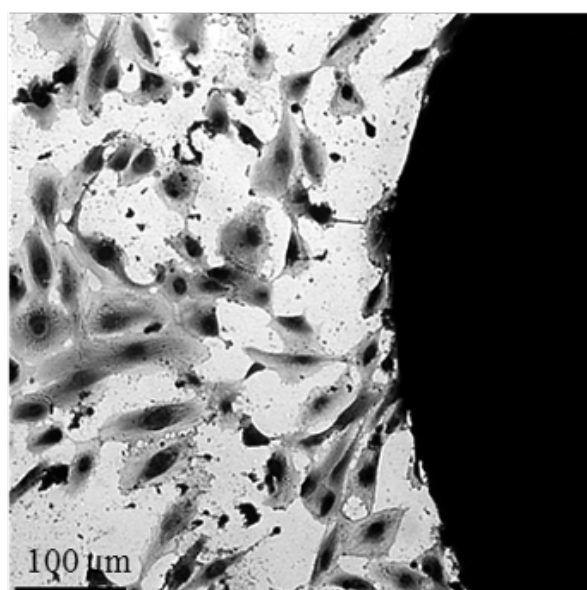
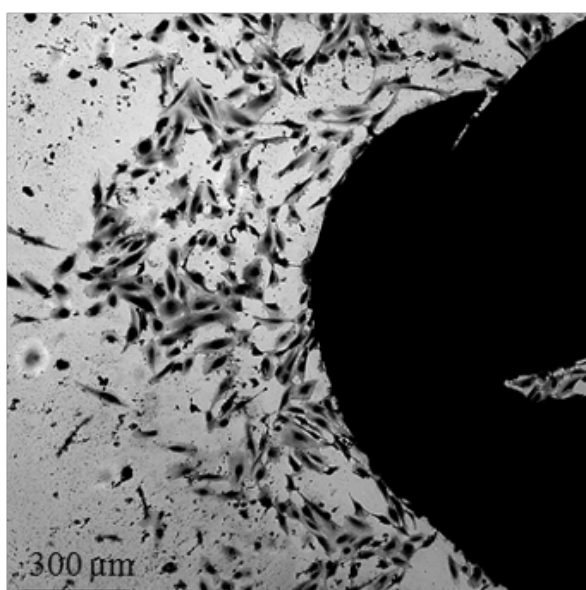
Времето на удвояване на ЛЕК клетъчните популации от двете пациентски групи бе различно. Необходимото време за достигане на около 70% клетъчна конфлуентност на първичните ЛЕК от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта бе една седмица по-дълго спрямо времето за култивиране до 70% конфлуентност на първичните ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта (Фигура 2). ЛЕК, изолирани от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта се характеризират със значително по-слаби миграционна и пролиферативна активности *in vitro*.

Последващата колективна миграционна (т. нар. *collective movement*) и колоногенна активност бяха наблюдавани на всеки 24 часа и беше определяно културалното време (времето на удвояване на клетъчната популация) необходимо за достигане на 60% клетъчна конфлуентност на първичните ЛЕК. На 22-рия ден от *in vitro* култивирането на пациентските експланти чрез *Crystal violet* микроскопия се установява категорична разлика в клоногенността на ЛЕК от недиабетно и диабетно болни пациенти. Ясно личат формиралите се големи плътно пакетирани ЛЕК колонии, без празни пространства между отделните многобройни клетки от възрастово обусловена катаракта. Контрастно на тях, ЛЕК колонии от диабет тип 2 индуцирана катаракта са малки, рехави, със значително по-малък брой клетки, с променена морфология, изразяваща се в променено съотношение цитоплазма/ядро (Фигура 2).

(A)



(B)



**Фигура 2. Колониоформиране:** *Crystal violet* микроскопски изображения - белязани колонии от 22-рия ден от *in vitro* култивирането на ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта - големи плътно пакетирани ЛЕК колонии (A) и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта - малки рехави ЛЕК колонии (B).

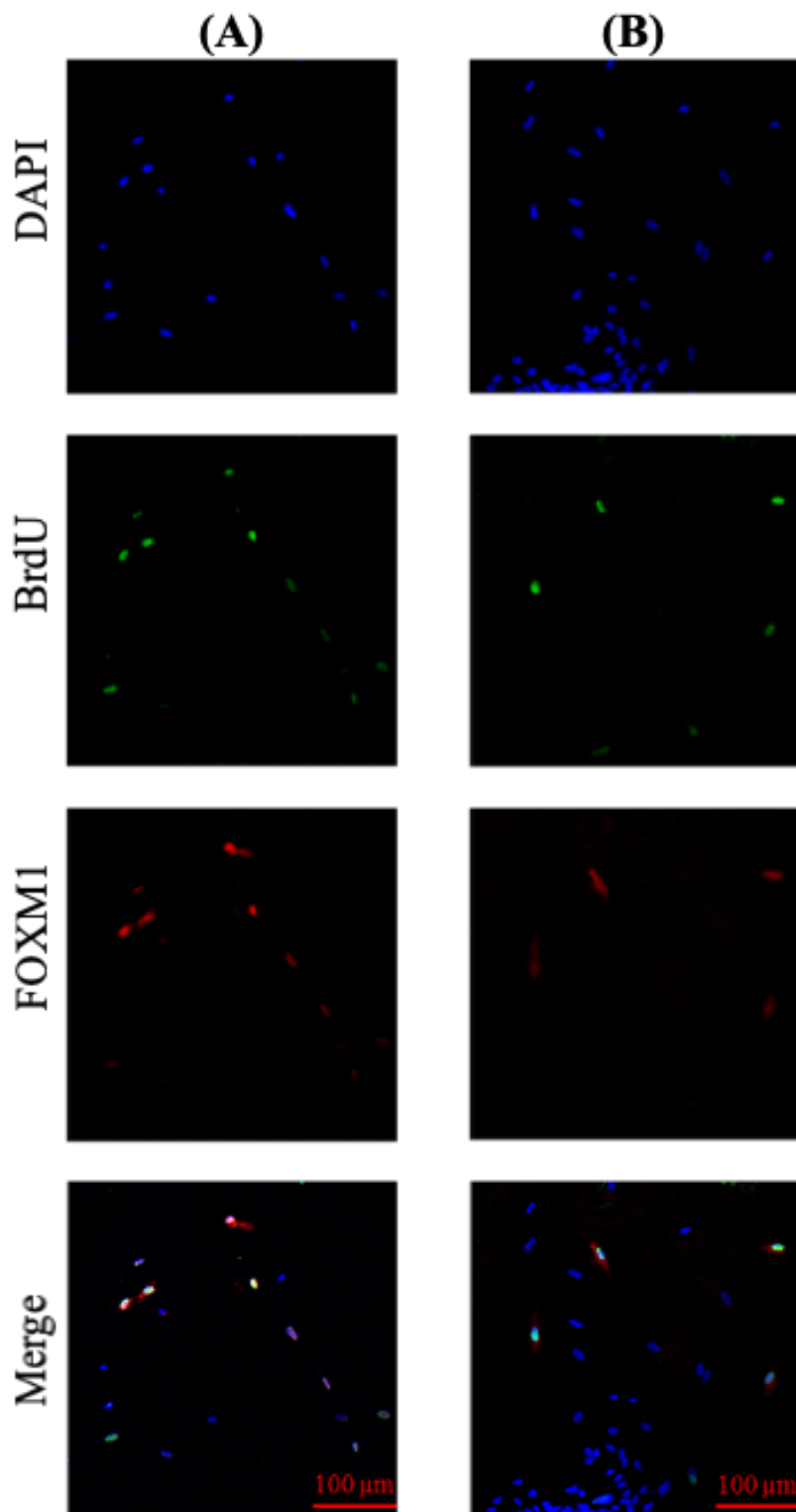
Въз основа на проведените Image-based high content screening анализи на *Crystal violet* микроскопските изображения се установява, че формиралите се колонии от ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта са трикратно по-малко в сравнение с колониите, формирани се от ЛЕК при възрастово обусловена катаракта (**Таблица 3**).

Тип катаракта	Възрастово обусловена	Диабет тип 2 - индуцирана
Колониоформиране	3.05X (1064 кл.)	X (349 кл.)

**Таблица 3. Колониоформиране – трикратно по-голям брой клетки (1064) при ЛЕК колониите от възрастово обусловена катаракта в сравнение с клетките (349) при колониите от диабет тип 2 индуцирана катаракта.**

С цел анализиране на пролиферативната активност на 22<sup>-рия</sup> ден от *in vitro* култивирането на пациентските експланти се проведе пролиферативен анализ на имунофлуоресцентно маркираните BrdU и FOXM1-белязани първични ЛЕК.

Чрез ДНК-свързващото багрило DAPI се идентифицираха клетъчните ядра. BrdU, инкорпиращ се в новосинтезирана ДНК, се визуализира в по-голям брой ядра при ЛЕК от възрастово обусловена катаракта в сравнение с ЛЕК от диабетно болни пациенти. Сред ЛЕК от възрастово обусловена катаракта се визуализира и по-висока експресия на транскрипционния фактор FOXM1, регулиращ генната експресия на белтъците от делителното вретено (Фигура 3).



**Фигура 3.** Мултифлуоресцентна микроскопия на имунофлуоресцентно маркирани BrdU и FOXM1-белязани първични ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (А) и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2- индуцирана катаракта (В). Визуализира

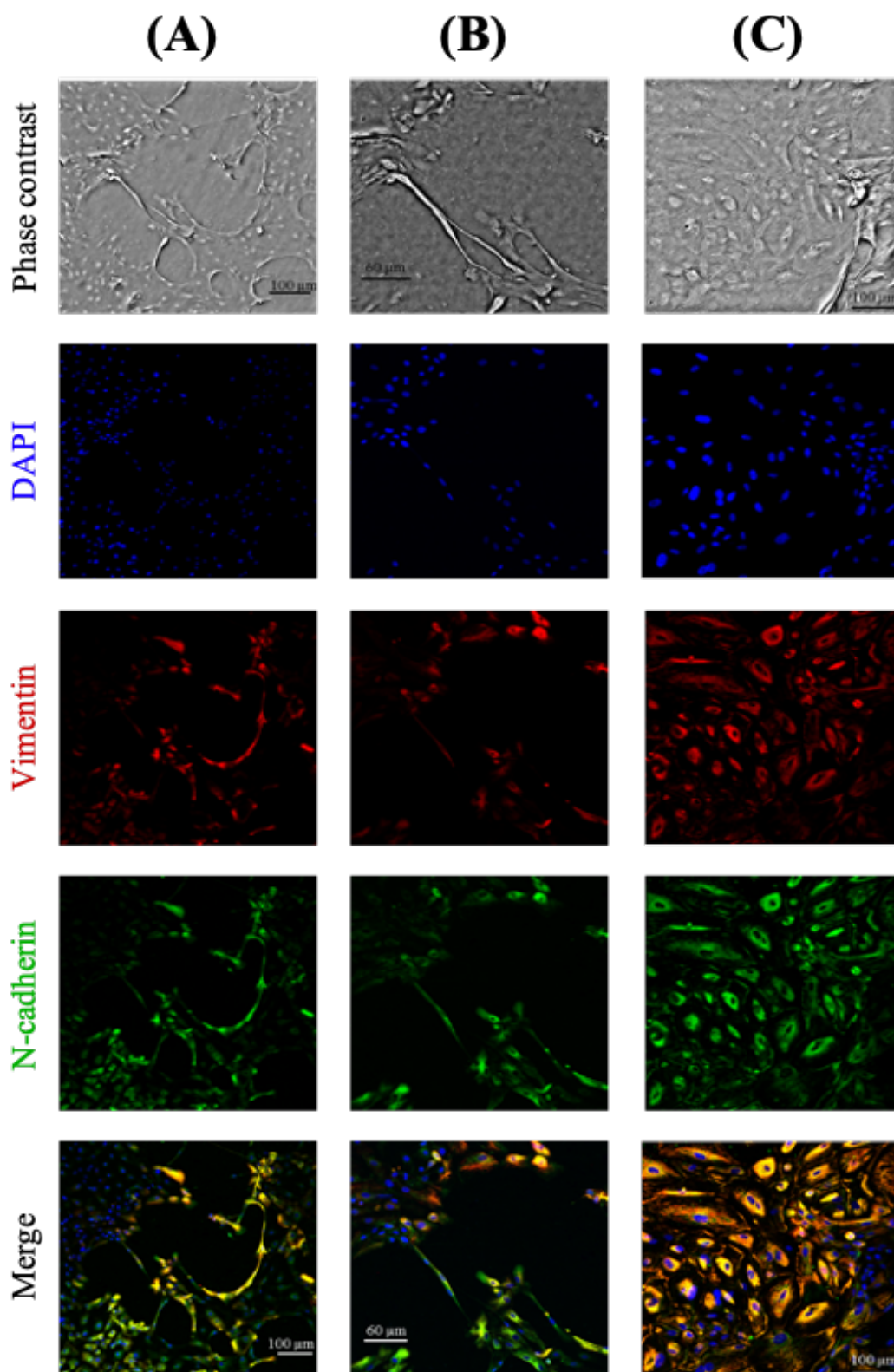
се новосинтезирана ДНК в по-голям брой ядра и по-висока експресия на транскрипционния фактор FOXM1 в група (А) в сравнение с група (В).

Проведените Image-based high content screening анализи показаха, че mean=55,76%, n=4, P<0.05 от ЛЕК от възрастово обусловена катаракта съдържат новосинтезирана ДНК и експресират FOXM1, докато само mean=33,45%, n=4, P<0.05 от ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта са пролиферативно активни. Установената по-слаба клоногенна активност сред ЛЕК от пациенти със ЗД2 е резултат от намалената пролиферативна активност.

### 3. Фазово-контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК.

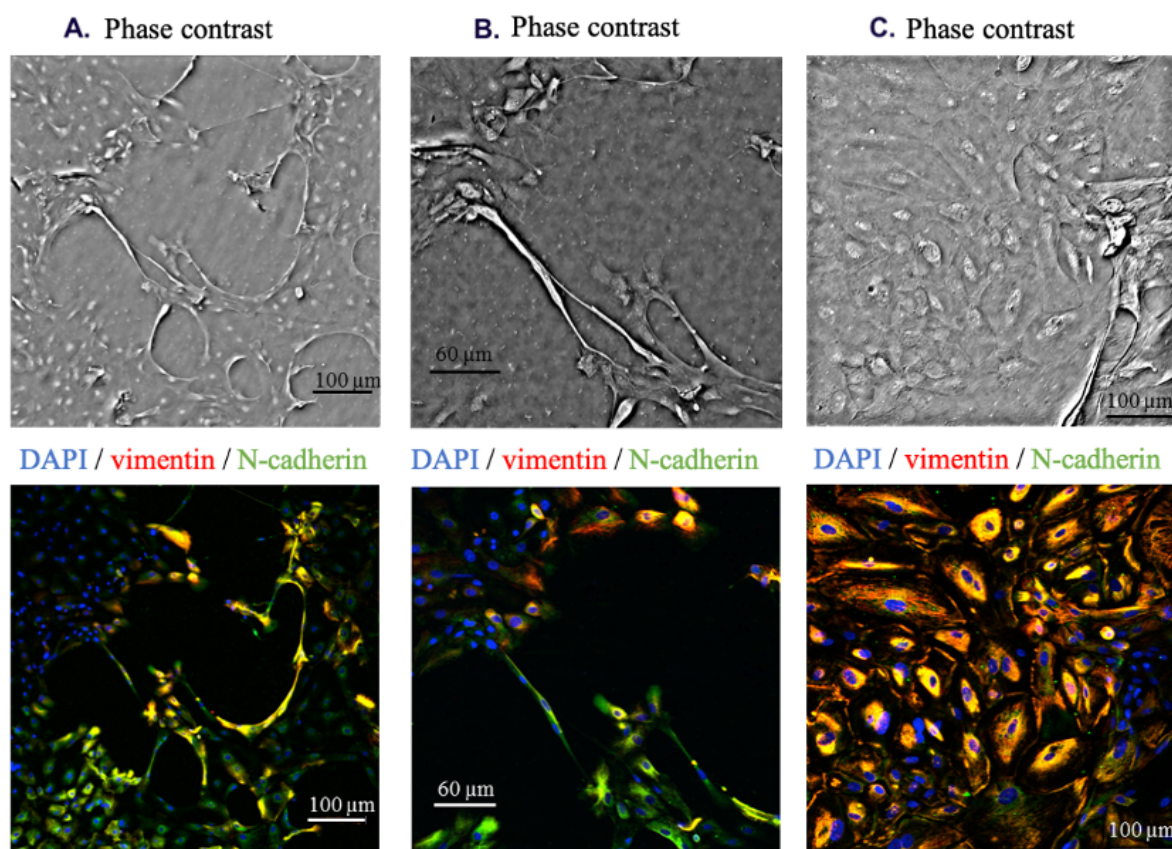
Морфологията на ЛЕК бе изследвана чрез фазово-контрастна микроскопия. При ЛЕК, изолирани от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта, бе наблюдавана *in vitro* начална промяна на епителния фенотип във фибробластоподобен. При 60% от първичните ЛЕК култури от пациенти със ЗД2 бе отчетена промяна в морфологията от кубична към фибробластоподобна. Такава промяна не бе наблюдавана сред ЛЕК от недиабетно болни пациенти. Морфологичните промени започваха около 14 дни след култивирането на пациентските експланти, а продължителността на процеса бе 7 до 8 дни. В края на периода фибробластоподобните клетки представляваха 20% от клетъчния състав на първичните култури. Тези клетки бяха пролиферативно неактивни, като между тях и пролиферативно активните ЛЕК се формираха празни пространства (Фигура 4).

Хетерогенните (съставени от ЛЕК и фибробластоподобни клетки) първични култури не бяха използвани в последващи експерименти, а бяха имунофлуоресцентно анализирани. Клетъчните ядра бяха идентифицирани на база DAPI. Анализира се наличието на Vimentin и на N-cadherin (Фигура 4).



**Фигура 4.** Фазово – контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (А) и (В), и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (С).

Установява се по-висока експресия на Vimentin и N-cadherin при ЛЕК от възрастово обусловена катаракта спрямо експресията им при ЛЕК от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (Фигура 4). При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се идентифицират по-голям брой клетъчни ядра, разположени периферно, без наличие на Vimentin и N-cadherin около тях (в клетките), съпоставени с ЛЕК от недиабетно болни пациенти (Фигура 5).

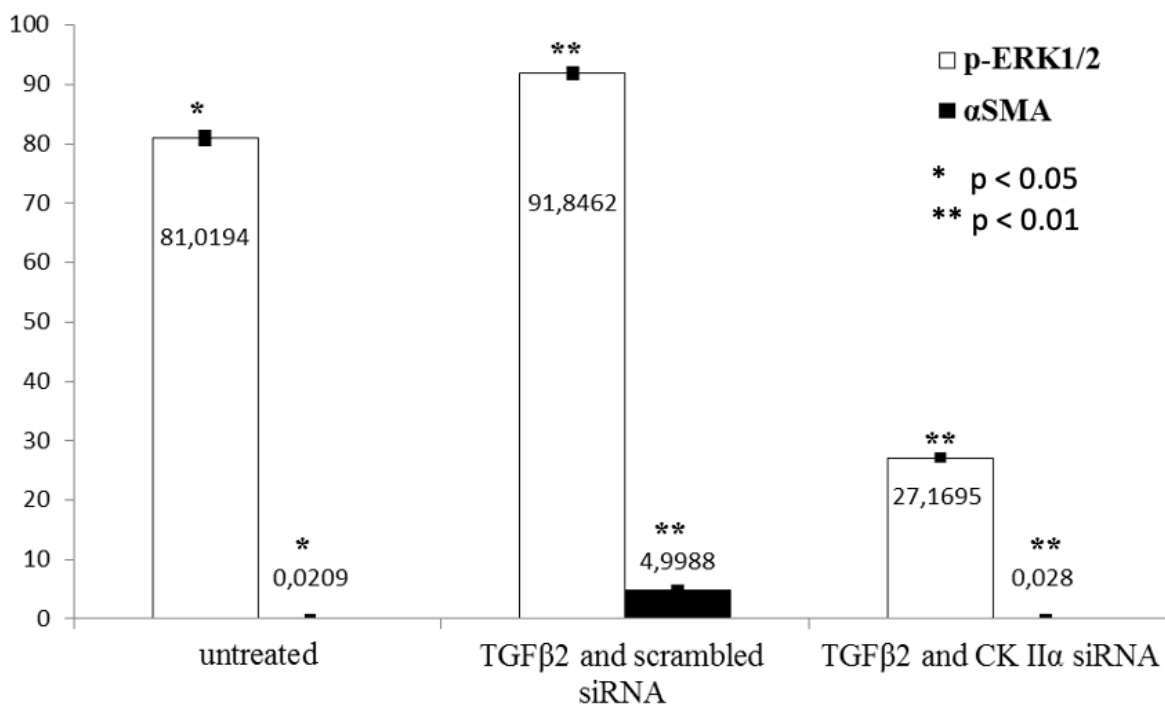


**Фигура 5. Обобщен фазово – контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК,** изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (А) и (В), и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (С). По-висока експресия на Vimentin и N-cadherin в група (С), спрямо група (А,В). По-голям брой периферно разположени клетъчни ядра, без наличие на Vimentin и N-cadherin около тях (вътреклетъчно) в група (А,В), в сравнение с група (С).

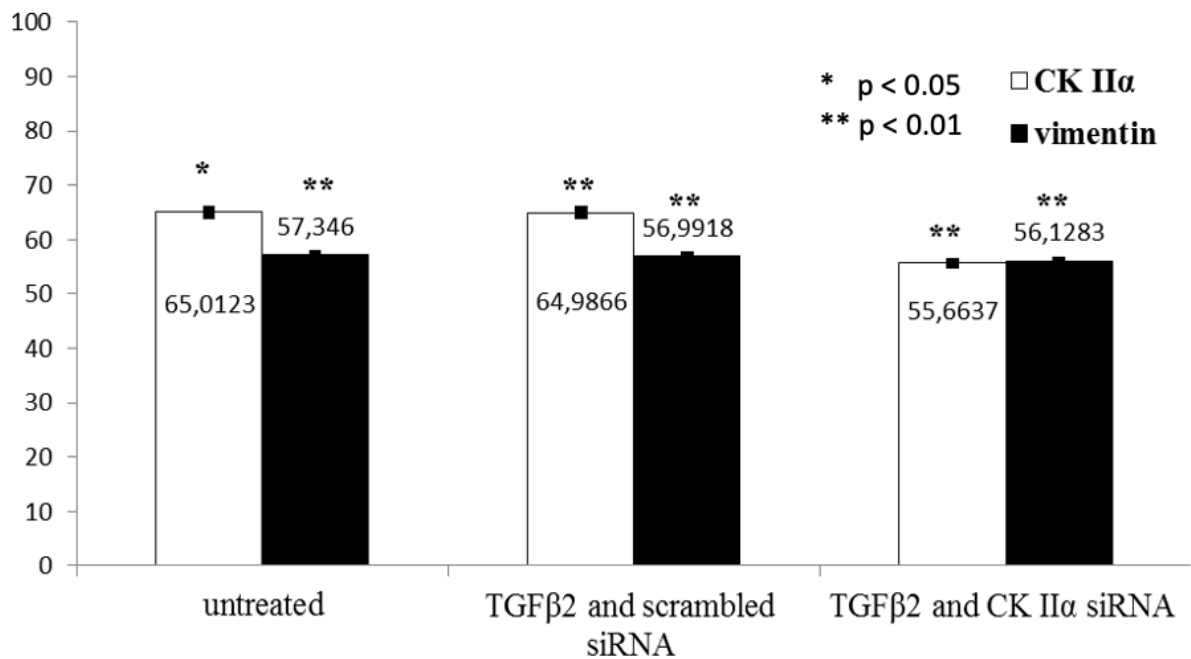
#### 4. Изследване на участието на протеин киназа CK2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК.

След проведено 24-часово третиране на ЛЕК с TGF-β2 се установява, че TGF-β2 статистически достоверно стимулира активността на ERK1/2. TGF-β2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 корелира с появата на експресиран αSMA (Фигура 6), но не корелира с експресията на цитоскелетния белтък vimentin (Фигура 7).

12-часовото siRNA-медирано заглушаване на ендегенната каталитична субединица (α) на протеин киназа CK2 статистически достоверно потиска TGFβ2-индуцираната повишена активност на ERK1/2 и понижава TGFβ2-индуцираната експресия на αSMA (Фигура 6).



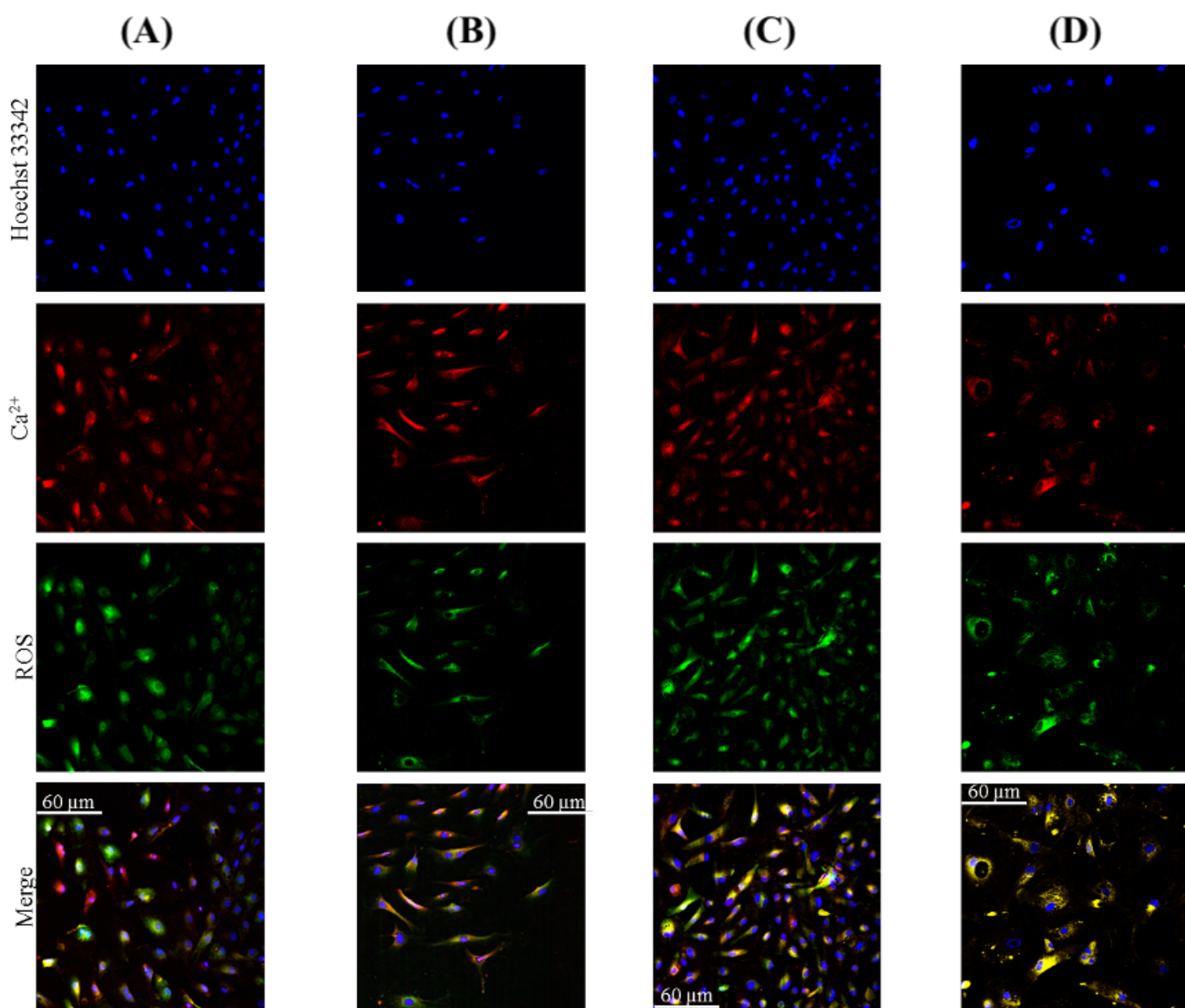
**Фигура 6.** Активност на ERK 1/2 (%) при 24-часовото третиране на ЛЕК с TGF-β2. TGF-β2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 корелира с появата на експресиран αSMA.



**Фигура 7.** Активност на СК2 (%) при 12-часовото siRNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица ( $\alpha$ ) на протеин киназа СК2. TGF- $\beta$ 2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 не корелира с експресията на цитоскелетния белтък vimentin.

5. **Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларният матрикс на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (**

6. **Фигура 8).**



**Фигура 8.** Тройно флуоресцентно маркиране на живи ЛЕК, изолирани от двустранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с възрастово обусловена катаракта (А), изолирани от двустранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с диабет тип 2- индуцирана катаракта (В), изолирани от едностранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с възрастово обусловена катаракта (С), изолирани от едностранно обагрени с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с диабет тип 2- индуцирана катаракта (D).

Въз основа на проведеното тройно флуоресцентно изследване се направи количествен анализ за изчисляване на средно статистическия екстрацелуларен калциев депозит и вътреклетъчния оксидативен стрес, отнесен към единична клетка.

Най-високо ниво на ROS (с изключение на пациента с карцином на дебелото черво) се установи при ЛЕК от *trypan blue* - двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 0,299. По-ниско ниво на ROS - 0,182 се установява при ЛЕК от *trypan blue* - едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2- индуцирана катаракта. ROS при ЛЕК от *trypan blue* - едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 0,238, а при ЛЕК от *trypan blue* - двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 0,208 (Фигура 9).

При ЛЕК от пациенти с възрастово обусловена катаракта се установяват по-високи нива на оксидативен стрес при едностранно обагрените (0,238) в сравнение с двустранно обагрените ЛЕК (0,208).

При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на оксидативен стрес при двустранно обагрените (0,299) в сравнение с едностранно оцветените ЛЕК (0,182).

Сред едностранно експозиранията на *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти без диабет (0,238).

Сред двустранно обагрените с *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (0,299).

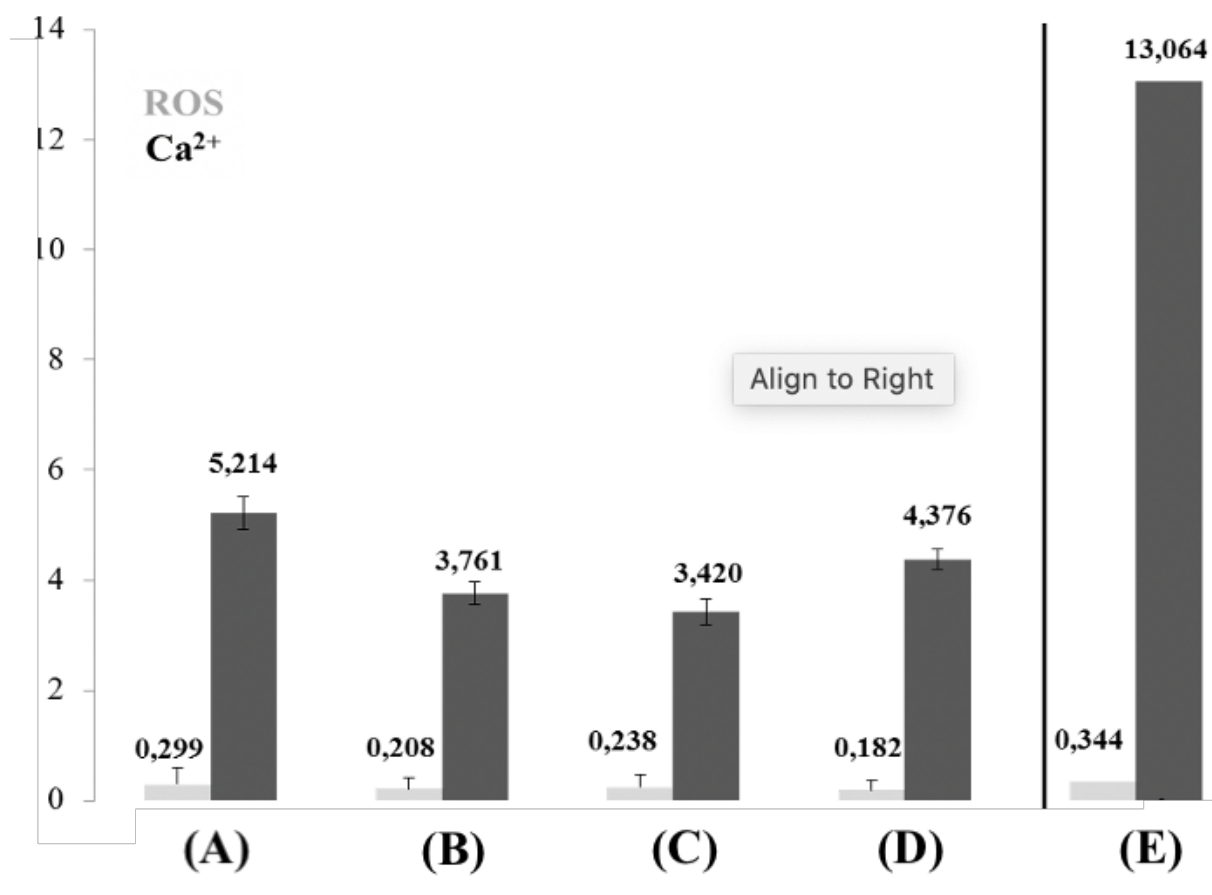
Най-високо ниво на калцификация на екстракапсуларния матрикс ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (с изключение на пациента с карцином на дебелото черво) се установи при ЛЕК от *trypan blue* двустранно оцветена ПЛК от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 5,214. Най-ниско ниво на калцификация на екстракапсуларния матрикс - 3,420 се установява при ЛЕК от *trypan blue* едностранно оцветена ПЛК от пациентите с възрастово обусловена катаракта.  $\text{Ca}^{2+}$  при ЛЕК от *trypan blue* едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 4,376, а при ЛЕК от *trypan blue* -двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 3,761 (Фигура 9).

При ЛЕК от пациенти с възрастово обусловена катаракта се установяват по-ниски нива на калцификация при едностранно обагрените (3,420) в сравнение с двустранно обагрените ЛЕК (3,761).

При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на калцификация при двустранно обагрени (5,214) в сравнение с едностранно оцветените ЛЕК (4,376).

Сред едностранно експозирани на *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на калцификация се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (4,376).

Сред двустранно обагрени с *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (5,214).



**Фигура 9.** Относителни нива на вътреклетъчния оксидативен стрес (ROS) и на калцификацията на екстрацелуларния матрикс (Ca<sup>2+</sup>) на живи ЛЕК, изолирани от двустранно обагрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта (A), изолирани от двустранно обагрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта (B), изолирани от едностранно обагрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта (C), изолирани от едностранно обагрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта (D), изолирани от едностранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с карцином на дебелото черво (E).

## Обсъждане

Миграция на първите клетки от експлантите на недиабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта започва около 6<sup>ти</sup> ден на *in vitro* култивирането. Това е потвърждение на публикуваните до момента литературните данни. Не се откриха изследвания, анализиращи първоначалната *in vitro* миграционна активност на *leader cells* от предна лещена капсула на пациенти със ЗД2. Резултатите представят изцяло нова информация, съществено обогатяваща познанието за клетъчно-физиологично обоснованите механизми на капсуларната опацификация.

Липсата на разлики в миграционните активности на *leader cells*, мигрирали от *in vivo trypan blue* обагрени и необагрени експланти доказва, че интраоперативното визуализиране с *trypan blue* на предната лещена капсула не афектира епитализационния капацитет на ЛЕК.

Интегритета на екстрацелуларния матрикс е от изключително значение за нормалното функциониране на клетките. Клетъчната и груповата миграция, адхезия, диференциация, както и тъканната организация и структура са пряко зависими от неговото състояние. ЗД2 оказва негативно влияние върху неговата структура и нарушава междуклетъчната комуникация. Наблюдава се намаляваща клетъчна плътност при възрастово обусловената катаракта с възрастта, а също така и по-ниска клетъчна плътност на ЛЕК при диабетно болни пациенти с катаракта в сравнение с недиабетно болни. Диабетната катаракта е сред най-ранните прояви на вторични усложнения, свързани със ЗД и асоциираните високи кръвни нива на глюкоза. Освен трите добре известни катарактогенни механизми (полиолов път, неензимно гликозилиране и повишен оксидативен стрес), актуални изследвания установяват допълнителен патогенетичен механизъм на диабетната катарактогенеза - ЕМП на ЛЕК, индуцирана от хипергликемия. ЕМП, отговорен също така и за вторичната катарактогенеза, се характеризира с фибробластоподобна клетъчна морфология, с редуциране на междуклетъчните връзки и епителните маркери, със същевременно увеличаване на маркерите за ЕМП (като  $\alpha$ -SMA, N-cadherin) и експресията на транскрипционни фактори. TGF- $\beta$  е най-добре изученият инициатор на ЕМП, който регулира генната експресия чрез посредничеството на Smad транскрипционни фактори. TGF- $\beta$  може също така да активира и не-Smad сигнални пътища (напр. ERK1/2), които водят до нарушаване на междуклетъчните връзки, до промяна на цитоскелета и клетъчния мотилитет. TGF- $\beta$ 2 е основният фактор, водещ до диференциация и фиброзиране на ЛЕК. В групата на диабетно болните бе наблюдавана спонтанната промяна в морфологията и епително-клетъчния фенотип на

ЛЕК от кубоидна към фибробластоподобна. Vimentin и N-cadherin са белтъци, експресирани в епителния клетъчен фенотип. Въпреки, че Vimentin е смятан за биомаркер за ЕМП, поради експресията си като интермедиерен филаментозен протеин и основен цитоскелетен компонент на мезенхимните клетки, той участва и в миграцията на епителните клетки. Тъй като е неразделна част от структурната цялост на клетката, образуването на ламелиподии и адхезионната сигнализация, понижаването на експресията на Vimentin е достатъчно, за да промени клетъчната морфология *in vitro*, както и да инхибира клетъчната подвижност. N-cadherin е гликопротеин, отговорен за междуклетъчната адхезия, участващ в структурата, както на влакнестите клетки на лещата, така и в структурата на ЛЕК. Неговата експресия води до усилен клетъчен мотилитет. Смятан е за маркер на ЕМП. N-cadherin също така стимулира клетъчния растеж, чрез блокиране на апоптотични сигнали. Намаленият синтез на N-cadherin води до нарушена междуклетъчна адхезия и до инициация на ЕМП. Въз основа на гореизложеното, установената по-ниска експресия на Vimentin и N-cadherin при ЛЕК от пациенти със ЗД2 води до промяна в клетъчната им морфология, намален мотилитет и съответно до намалена миграционна активност. Наблюдаваната *in vitro* начална промяна на епителния фенотип на ЛЕК във фибробластоподобен в групата на ЛЕК от диабетно болни пациенти може да се приеме за начален етап на епително-мезенхимен преход.

Установената разлика в колониообразуването на ЛЕК, изолирани от диабетно и недиабетно болните пациенти (Фигура 2) се дължи на различна пролиферативна активност при двете групи. Това бе доказано чрез имунофлуоресцентното изследване на инкорпурирането на BrdU в новосинтезираната ДНК и експресията на транскрипционния фактор FOXM1 (Фигура 3), регулиращ генната експресия в митотичното вретено. Въз основа на по-малкото съдържание на новосинтезирана ДНК и по-ниска експресия на FOXM1, който е сигурен маркер за клетъчна пролиферация, обуславяйки прехода от G1/S към G2/M, можем да обобщим, че пролиферативната активност на ЛЕК от пациенти със ЗД2 е по-ниска от тази на ЛЕК от недиабетно болни пациенти. Негативната връзка между диабета и пролиферацията на ЛЕК се потвърждава от Sundelin и сътрудници. По-слабата клоногенна активност на ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта корелира с тяхната намалена пролиферативна активност. Формирането на по-малки и по-рехави колонии от диабетните ЛЕК се свързва също така с понижен клетъчен мотилитет и миграция, и нарушена междуклетъчна адхезия в резултат на по-слабата експресия на Vimentin и N-cadherin.

Повечето офталмолози имат клиничното впечатление, че диабетно болните пациенти развиват по-бързо и по-изразена ВК, спрямо недиабетно болните. Редица проучвания откриват формиране на по-екстензивно уплътняване на задната лещена капсула при диабетно в сравнение с недиабетно болните. Установената намалена пролиферативна активност на ЛЕК от пациенти със ЗД2 тласка клетките към спонтанна начална промяна на епителния фенотип във фибробластоподобен (Фигура 4), инициация на ЕМП и вероятно по-ранна проява на фиброзиране на задната лещена капсула при диабетно болните.

Противоположно на тези изследвания, други проучвания показват сходна или дори по-ниска честота на образуване на ВК сред пациентите със ЗД. Теоретично погледнато, доказаните в настоящия труд по-ниски миграционна, пролиферативна и клоногенна активности на диабетни ЛЕК предоставят възможно обяснение за описаната по-ниска честота на ВК при диабетно болните.

Растежния фактор TGF $\beta$ 2, който се счита за основния сигнал, индуциращ епително-мезенхимният преход в патогенезата на ВК, се трансдуцира по ERK1/2-зависима сигнализация, която води до генна експресия на неепителния цитоскелетен белтък  $\alpha$ SMA в *in vitro* култивирани ЛЕК, изолирани от пациентски експланти. И тъй като до настоящия момент няма литературни данни за изследване на участието на протеин киназа CK2 в сигнализацията, поддържаща клетъчната физиология на ЛЕК, за първи път се разкрива, че функционирането на ERK1/2 е регулирано от конститутивно активната хетеротетрамерна (2 каталитични  $\alpha$  и 2 некаталитични  $\beta$  субединици, продукти на различни гени) протеин киназа CK2 в този клетъчен фенотип.

ROS участват активно в процеса на индуциране на апоптоза в норма и патология. Едновременно източник и таргетна структура на ROS са митохондриите. Образуването на различни видове катаракти се свързва с оксидативния стрес, причинен от ROS, индуцирания апоптоза, заедно с намалена антиоксидантна активност и нарушена калциева хомеостаза. Повишеният оксидативен стрес и намалената антиоксидативна активност нарушават функцията на Ca<sup>2+</sup> АТФ-ази и Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> обменници, водейки до покачване на вътреклетъчната калциева концентрация и калциеви отлагания. Повишените нива на калций причиняват апоптоза на ЛЕК, агрегация на лещени протеини, активиране на протеази, разграждащи основни структурни протеини и формиране на лещени мътнини. Физиологично извънклетъчно отлагане на калциев депозит се наблюдава само в костно-скелетната система, следователно калцификацията на екстрацелуларния

матрикс на лещено епителните култури е патологична изява. При диабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта се открива по-ниска антиоксидантна активност в сравнение с недиабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта. В настоящия труд най-високите нива на калциев депозит се откриват именно сред пациентите със ЗД2. Оксидативният стрес и повишената калциева концентрация активират протеин киназа С. Тъй като доказахме, че СК2 регулира ERK1/2 и съответно ЕМП, която води до диференциация на ЛЕК, можем да предположим, че установените по-високи нива на ROS и Ca<sup>2+</sup> в групата на ЛЕК от диабетно болни пациенти са активирали СК2. Процес, който е дал началото на ЕМП и е довел до начална фенотипна промяна на диабетните ЛЕК. Редица други фактори (като оперативна техника, дизайн и материал на ВОЛ, диабетен статус, постоперативно възпаление и др., които не са предмет на настоящето изследване могат да оказват влияние върху формирането на ВК.

Въпреки че не се открива разлика в миграционната активност на необагрене и интраоперативно (едностранно) обагрене ЛЕК с *trypan blue*, при двустранно обагрените с *trypan blue 0.06%* експлантите от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на калциев депозит и оксидативен стрес. Вероятно, увреда на плазматичните мембрани на ЛЕК в резултат на липидна пероксидация при диабетно болните пациенти ги прави частично пропускливи за багрилото. Въз основа на тези и наскоро публикувани данни, директна експозиция на ЛЕК с *trypan blue* при пациенти със ЗД2 би могла да оказва негативен ефект върху физиологичната им цялост.

Освен помътняването на задната лещена капсула, което води до намаляване на зрителната острота, пролиферацията на остатъчните ЛЕК води до вторични усложнения в резултат на създадените механични сили. Те са причина за стрии, гънки на задната лещена капсула и потенциално тракционно-индуцирано децентриране на изкуствената вътреочна леща. Офталмоскопията и лазерната фотокоагулация се извършват трудно или дори не могат да бъдат осъществени при наличие на тежка ВК. Прозрачността на лещената капсула е от изключително значение, особено при диабетно болни пациенти, при които често се наблюдава формиране на силно проявена ВК.

## Изводи

1. ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта се характеризират със значително по-слаба миграционна, пролиферативна и клоногенна активности *in vitro* спрямо активностите *in vitro* на ЛЕК от възрастово обусловена катаракта.
2. Липсата на разлики в миграционните активности на *leader cells*, мигрирали от *in vivo trypan blue* обагрени и необагрени експланти доказва, че интраоперативното визуализиране с *trypan blue* на предната лещена капсула не афектира епитализационния капацитет на ЛЕК при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
3. Компрометираният от диабет тип 2 фенотип се характеризира с намален синтез на ДНК, което тласка клетките към инициация на епително-мезенхимен преход. Нарушени молекулярни механизми повлияват миграционната, пролиферативната и спонтанната диференциационна активност на лещено епителните клетки при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
4. Протеин киназа CK2 регулира ERK1/2, независимо от растежният фактор TGF $\beta$ 2, считан за основния сигнал, индуциращ епително-мезенхимния преход в патогенезата на капсулната опацификация. ERK1/2-зависима сигнализация води до генна експресия на неепителния цитоскелетен белтък  $\alpha$ SMA в *in vitro* култивирани ЛЕК, изолирани от пациентски експланти.
5. Основна причина за формиране на възрастово обусловената и диабет тип 2 индуцираната катаракти е увреждането на лещата в следствие на образувалите се свободни радикали (ROS) и асоциираните с тях повишени нива на екстрацелуларен калциев депозит.

## Приноси

1. За първи път у нас бяха получени първични ЛЕК култури, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
2. За първи път се изследва първоначалната *in vitro* миграционна активност на *leader cells* от експланти от предна лещена капсула на пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. Резултатите представят изцяло нова информация, съществено обогатяваща познанието за клетъчно-физиологично обосноващите механизми на капсулната опацификация. Установената, на около 6-тия ден от *in vitro* култивирането, миграция на първите клетки от експлантите от предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта е потвърждение на литературните данните.
3. За първи път се установява участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, поддържаща клетъчната физиология на ЛЕК. За първи път се разкрива, че функционирането на ERK1/2 е регулирано от конститутивно активната протеин киназа СК2 в този клетъчен фенотип.
4. Доказа се, че основните характеристики на *in vitro* култивираните ЛЕК комплексно отразяват фенотипната изява на типа катаракта, от която са изолирани. Това е солидна основа за използването на ЛЕК първични култури, изолирани от български пациенти в разнопосочни изследвания с практическа и научно-изследователска насоченост.
5. Настоящото изследване е първото по рода си у нас, което допринася за изясняването на механизмите на катарактогенезата и молекулните механизми, обуславящи последващата поява на вторичната катаракта при пациенти с диабет тип 2.

## СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. V. Haykin, Y. Zdravkov, A. Isaeva, S. Kostova, Iv. Tanev. Prevalence of Arterial Hypertension and Diabetes Mellitus among Cataract Patients. *Trakia Journal of Sciences*. 2019; 17(3): 208-211.
2. V. Haykin, A. Oscar, V. Dimitrova, I. Petkova, Y. Zdravkov, S. Kostova, N. Veleva, V. Mitev, A. Isaeva. Bioimage Analysis of Cell Physiology of Primary Lens Epithelial Cells from Diabetic and Non-Diabetic Cataract Patients. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2021, 35 (1), 170–178.
3. В. Хайкин, Я. Здравков, С. Костова, В. Димитрова, А. Исаева, А. Оскар. Средна възраст на пациентите със и без захарен диабет тип 2 при провеждане на оперативно лечение на възрастово обусловена катаракта. *Български офталмологичен преглед*. Под печат

## СПИСЪК С УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. В. Хайкин, Ив. Танев, И. Петкова, Я. Здравков, В. Шумналиева, В. Димитрова, А. Исаева. Изследване на миграционна и пролиферативна активност, и спонтанна диференциация на човешки първични лещено епителни клетъчни култури на пациенти с възрастово обусловена и диабет тип II индуцирана катаракта. Новости в Офталмологията 23 – 25 ноември 2018, РИУ Правец. Първо място за най-добър електронен постер.
2. В. Хайкин, Ив. Танев, А. Оскар, Я. Здравков, С. Костова, И. Петкова, Н. Велева, В. Димитрова, В. Митев, А. Исаева. Изследване на оксидативен стрес и калциев депозит на човешки първични епителни клетки от изолирани интраоперативно и третиран с truap blue предни лещени капсули от пациенти с възрастово обусловена катаракта. XIII<sup>ти</sup> конгрес на българско дружество по офталмология, 24-27 октомври 2019, Боровец. Първо място за най-иновативен електронен постер.

## СПИСЪК С НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. ДОГОВОР № Д-112/02.05.2017 на тема: „ Био имидж изследвания на клетъчната физиология на първични човешки клетъчни култури, изолирани от *in vivo* интраоперативно третирани с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с възрастово-обусловена катаракта и вродена катаракта” от конкурса „ГРАНТ-2017” на МУ-София
2. ДОГОВОР № Д-66/02.05.2017 г. на тема: „Image-Based High Content Screening анализи на участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, обуславяща TGFβ2-индуцирания епително-мезенхимен преход на човешки епителни лещни клетки (LECs), изолирани от антериорен субкапсуларен катаракт” от конкурса „ГРАНТ-2017” на МУ-София
3. ДОГОВОР № Д-100/23.04.2019 на тема: „Изследване на експресията на апоптотичния фактор Caspase-3 в човешки първични епителни клетки от изолирани интраоперативно и третирани с *trypan blue* предни лещени капсули от пациенти с възрастово обусловена и диабет тип II индуцирана катаракта” от конкурса „ГРАНТ-2019” на МУ-София