



РЕЦЕНЗИЯ

за

присъждане на научната степен „Доктор на науките“ в област на висшето образование 4. *Природни науки, математика и информатика*, професионално направление 4.2. *Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“*

на

Дисертационен труд на тема: „Нитроксидните радикали като контрастни субстанции за диагностика на патологии, свързани с нарушения в проницаемостта на кръвоносните съдове и клетъчния редокс-статус“

на

доц. д-р Живко Желязков Желев
катедра „Медицинска химия и биохимия“, МФ-ТрУ, гр. Стара Загора

изготвена от

от проф. д-р Антоанета Младенова Желева – катедра „Медицинска химия и биохимия“,
МФ-ТрУ, гр. Стара Загора

Оценка на актуалността и дисертабилността на дисертационния труд

Реактивните кислородни видове (ROS) играят важна роля в регулиране и оцеляване на клетките. В умерени концентрации ROS участват в сигнализирането, йонните канали, транскрипционните фактори и биосинтетичните процеси в организма. Когато не надвишават определени нива ROS могат да функционират като сигнали за стимулиране на клетъчната пролиферация и оцеляване, докато драстичното увеличаване на тези нива може да предизвика клетъчна смърт. При физиологични условия, балансът между генерирането и елиминирането на ROS запазва и поддържа нормалната функция на чувствителните на редукция сигнални протеини. Редокс хомеостазата е тази, която гарантира, че клетките реагират правилно на ендогенни и екзогенни стимули. Когато тя е нарушена, оксидативният стрес може да доведе до аномална клетъчна смърт и да допринесе за развитието на болест. Свързаните с ROS заболявания могат да се дължат, както на недостиг, така и на излишък от ROS. Тъй като биологичната активност на ROS зависи не само от концентрацията, но и от пространственото разпространение, то изображението в реално време и *in vivo*, се е превърнало във важна необходимост за учени, с цел клинично приложение. През последните 10-15 години бяха разработени нови техники за изобразяване, както и нови контрастни средства, които да се прилагат в клинични условия. Основното изискване за постигане на идеална техника за изобразяване е, че тя трябва да: **a)** изследва и определя ROS промените с висока пространствено-времева разделителна способност; **b)** да открива физиологично

значими вариации в концентрацията на ROS и в) да осигурява специфичност към различни редукционни двойки. Освен това, за *in vivo* приложения, бионалични уреди, проникването в тъкани и високата степен сигнал-шум са допълнителни изисквания, които трябва да бъдат съобразявани. Въщност на този етап представените техники не отговарят на всички изисквания за клинично приложение. Очевидно е, че в бъдеще трябва да се разработи и внедри такава техника, която да отговаря на всички по-горе споменати изисквания в резултат, на което да се реализира един комплекс от анатомично и функционално изображение, предоставящ пълна информация за редокс състоянието на изследвания *in vivo* обект.

В представения ми за рецензия дисертационен труд са проведени изследвания свързани с използване на нитроксидни радикали като сензорни молекули за разработването на нови методични подходи за анализиране на редокс-статуса на живи клетки и тъкани, както и промените, настъпващи в проницаемостта на кръвно-мозъчната бариера, които са индуцирани от различни патологични състояния, предизвикващи митохондриална дисфункция и оксидативен стрес в клетки. В дисертационния труд се предлагат методични подходи, които се основават на промяната на контрастните свойства на нитроксидни радикали и техни производни при преминаването им от парамагнитна форма в диамагнитна форма и обратно, което се регистрира с нитроксид-усилен магнитно-резонансен имиджинг (МРИ) и електрон-парамагнитен резонанс (ЕПР) спектроскопия. Като се има предвид, че на този етап разработените нови техники за изобразяване на редокс състоянието на клетки и тъкани, както и предложените към тях нови контрастни средства, не отговарят на всички изисквания за клинично приложение е очевидно, че тематиката на дисертационния труд е актуална и вероятно в бъдеще ще може да намери практическо приложение за визуализиране и анализ на редокс състоянието на изследваните обекти особено *in vivo*, което съответно е тясно свързано с нуждите на образната диагностика и биомедицинските изследвания.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен на 262 стандартни страници и съдържа 103 фигури 14 таблици и 528 литературни източника. Налице е много добро структуриране и оформление като съответните раздели - въведение, обзор на литературата, цел и задачи, материали и методи, експериментални резултати и дискусия, изводи и приноси са логически обосновани, адекватни и балансиранi.

Във въведението на дисертационния труд е обърнато специално внимание на редокс-статусът, който е разгледан като важен диагностичен маркер, а също и терапевтичен прицел при всички патологии, свързани с нарушения в клетъчната редокс-сигнализация. Обоснована е важността на методите, анализиращи общия редокс-статус на клетките, тъканите и телесните течности в организма, като е подчертано, че идеалният методичен подход трябва да осигурява пряка и неинвазивна детекция *in vivo*. Изложени са условията, на които трябва да отговаря идеалната редокс-чувствителна контрастна субстанция. На база на тези условия като едни от най-атрактивни редокс-чувствителни контрастни субстанции са

посочени цикличните нитроксидни радикали, които могат да се регистрират и анализират, както *in vitro*, така и *in vivo* чрез различни магнитно-резонансни техники като електрон-парамагнитен резонанс (EPR) и магнитно-резонансен имиджинг (MRI).

Оценка на литературния обзор

В раздела „Обзор на литературата“ е направена изчерпателна литературна справка върху нитроксидните радикали, като контрастни субстанции за магнитно-резонансна образна диагностика. Направен е подробен преглед на изследванията във връзка редокс-имиджинг *in vivo* и *in vitro* при индукция на оксидативен стрес с използване на нитроксидите като контрастни субстанции. Разгледано е приложението на нитроксидни радикали за редокс-имиджинг на мозък, тумори, кожа и абдоминални органи, както и използването на спин-улавящите агенти (спин-капани) със същата цел. Доста подробно е направен литературен обзор и на използване на цикличните хидроксиламини в редокс визуализирането на биологични обекти. В последната част на раздела в обобщен вид в таблица са представени най-широко използваните по настоящем редокс-чувствителни контрастни субстанции и методите за тяхната детекция *in vitro* и/или *in vivo*. Основните принципи на три от тези методични подхода са разгледани подробно от доц. Желев, тъй като същите са използвани в дисертационния труд за верифициране на резултатите от проведените нитроксид-базирани EPR и MRI анализи. В края на литературния обзор е направено обобщение, от което се вижда, че на този етап EPR и MRI техниките са мощен инструмент в експерименталните и предклиничните изследвания на ROS и редокс-статуса на биологични обекти не само *in vitro*, но и *in vivo*. Описани са основните линии, в които са насочени усилията на учените за усъвършенстване на EPR/MRI изследванията, като е обърнато внимание, че съществуват множеството фактори, които биха могли да доведат до неточна интерпретация на резултати получени при изследване на *in vivo* регистриран нитроксид-усилен EPR/MRI сигнал. Направеното по този начин обобщение довежда дисертанта съвсем логично до формулиране на целите и задачите на дисертационния си труд.

Оценка на формулираните цели и задачи

Целите, както и свързаните с тях задачи са кратко и ясно формулирани и напълно съответстват на темата, което позволява последователно разработване на проблематиката и достигане в края на дисертационния труд до адекватни изводи. За изпълнение на целите са формулирани седем основни задачи. Като се има предвид, големият брой изследвани преби в *in vitro* и *in vivo* системи и съответстващи им по брой и вид изследвани показатели е очевидно, че дисертантът успешно се е справил с двете основни цели на дисертационния труд, а именно: да се изследва връзката между физико-химичните свойства на нитроксидните радикали и възможностите за използването им като контрастни субстанции за магнитно-резонансна диагностика на патологии, придружени с нарушения в проницаемостта

на кръвоносните съдове и/или с редокс-дисбаланса и развитие на оксидативен стрес, както и да се изясни ролята на някои ендогенни окислители и редуктори в динамиката на нитроксид-усилния EPR и MRI сигнал.

Оценка на раздела *Материали и методи:*

Този раздел включва **20** страници, като за доказване на изложените научни хипотези е използван широк набор от съвременни методи и техники, както и много експериментални схеми, които са ясно и пълно описани и позволява да бъдат възпроизведени, което е допълнителна гаранция за достоверността на получените резултати. Подходящо подбраните за изследване показатели са тясно свързани с целите и задачите на дисертационния труд, което доставя надеждна информация относно редокс състоянието в изследваните *in vitro* и *in vivo* системи, а също и промяната на това състояние при преминаване от норма в патология.

Оценка на раздела *Експериментални резултати и обсъждане*

Разделът включва **137** стандартни страници и онагледен общо с **84** фигури и **13** таблици. За отбелязване е, че получените резултати и тяхното обсъждане са обединени, което в случая намирам за уместно, тъй като повечето от проведените експерименти предоставят голям обем информация, която е удобно да бъде дискутирана веднага. Бих искала да акцентирам на отличното графично оформление на експерименталните резултати и детайлите под фигуранте, което улеснява възприемането на данните и тяхната интерпретация в текста.

Статистическата обработка на резултатите е извършена със софтуерните продукти *Origin*, *Excel* и *GraphPad InStat*, като са използвани два теста за достоверност: *Student's t-test* или *Bonferroni multiple t-test*; както и линеен корелационен анализ.

В началото на раздела са описани резултатите от изследване връзката между физико-химичните свойства на серия от нитроксидни радикали с различна водоразтворимост (хидрофилни, амфифилни и хидрофобни) и динамиката на контрастните им свойства *in vitro* във физиологични течности, *in vivo* в кръвния ток на мишки и *ex vivo* натрупването им в тъкани, като е показано, че хидрофобните шестчленните нидроксид съдържащи съединения SLENU и SLCNUgly и амфифилният TEMPOL преминават лесно през клетъчните мембрани и КМБ, докато при хидрофилните тази проницаемост е частична (слаба) за CMPx, а за CPx практически са непроницаеми, поради което в проведените *in vivo* експерименти, последните са използвани предимно като негативни контроли.

На база на установената лесна проницаемост на шестчленните нидроксид съдържащи съединения SLENU, SLCNUgly и TEMPOL е постигнато визуализиране на проникването на нитроксидния радикал TEMPOL и нитроксид-белязани лекарствени средства SLENU и SLCNUgly през кръвно-мозъчната бариера, като е изследвана динамиката и разпределението на нитроксид-усилния MRI сигнал в мозъка на здрави мишки.

Чрез подбор на специален режим на скениране MRI сигналите на SLENU и SLCNUgly са регистрирани, както в мозъчните тъкани, така и във вентрикулите на мозъка, което показва че двете съединения се локализират не само в мозъчните тъкани, но и в церебро-спиналната течност. Изследвана е и динамика на нитроксид-усилния MRI сигнал на водоразтворимите нитроксид съдържащи съединения CMPx и CPx, която както се очаква е различна от тази на TEMPOL, SLENU и SLCNUgly. Доказано е, че CMPx прониква трудно и бавно през КМБ, докато при инжектиране на CPx в мозъчните тъкани не се регистрира нитроксид-усилен MRI сигнал. Иновативното в това изследване е, че за първи път се докладва маркиране на лекарствени средства с нитроксиден радикал и неинвазивно визуализиране на проникването им през КМБ и локализиране в мозъчните тъкани, чрез използване на нитроксид-усилен MRI, освен това чрез проследяване динамиката на нитроксид-усилния MRI сигнал на нитроксидните радикали, проникващи през клетъчните мембрани, се доставя информация и за редокс-статуса на тъканите. От така получените резултати се заключава, че хидрофобните нитроксиди са по-подходящи от водоразтворимите за използването им като редокс-чувствителни контрастни субстанции за анализ и оценка на клетъчния, resp. тъканния редокс-статус *in vitro* и *in vivo*.

По нататък чрез използване на MRI техника и хидрофилния CMPx като контрастна субстанция (подходящо подбран за тези експерименти) е изследвана възможността за визуализиране на промени в проницаемостта на кръвоносните съдове и функцията на бъбреците при мишки с експериментален модел на хиперхолестеролемия, като получените резултати са верифицирани чрез използване на конвенционална контрастна субстанция (Gd-DTPA). Изследвано е също и влияние на антилипидемични лекарствени средства върху динамиката на нитроксид-усилния MRI сигнал на CMPx в бъбреците при мишки с хиперхолестеролемия. Направен е сравнителен анализ между здрави животни и животни с хиперхолестеролемия. Показано е, че проследяване динамиката на нитроксид-усиленият MRI сигнал на CMPx позволява да се визуализира бъбречна дисфункция, индуцирана от хиперхолестеролемия и да се направи оценка на ефекта на антилипидемични лекарствени средства върху функцията на бъбреците.

По нататък в същия раздел в частта озаглавена: “Нитроксидните радикали като контрастни субстанции за визуализиране и анализ на тъканния редокс-статус *in vivo*, с използване на MRI при експериментални модели на тумори” са представени и обсъдени резултатите получени при изследване възможността за различаване на ракови от неракови клетки и тъкани на базата на различния им редокс-статус, чрез използване на нитроксидни радикали, като редокс-сензори и нитроксид-усилен MRI, както и каква структура и физико-химични свойства, трябва да притежават тези нитроксидни радикали, за да се визуализира и анализира клетъчният и тъканният редокс-статус *in vivo* и *in vitro*. Съвсем насърко различни изследователски групи публикуват изследвания *in vivo* с животни-тумороносители, при които се използва като ендогенен редокс-сензор ¹³C-дехидроаскорбат и хиперполаризиран MRI и установяват, че туморните тъкани се

характеризират с по-високи нива на глутатион и аскорбат, в сравнение с нормалните, като съотношението окислена/редуцирана форми на двете субстанции в туморната тъкан е в полза на окислената форма, докато в нормалните тъкани е в полза на редуцираната форма. Резултатите от тези изследвания предполагат, че редуцирацият капацитет на нормалните тъкани би следвало да бъде по-висок от този на туморните. Проведените експерименти в тази част на разделя от дисертационния труд потвърждават напълно по-горе казаното, като освен това дисертантът предлага нов подход за неинвазивно визуализиране на тъканния редокс-статус на интактни бозайници – здрави и тумороносители, който позволява идентифициране на раковите от нормалните тъкани *in vivo*. Установеният факт, че *in vivo* нитроксидите съществуват в две форми: радикал и хидроксиламин и, че окислители и редуктори могат да редуцират нитроксида до съответния хидроксиламин, за който е известно, че единствено при взаимодействие с $O_2^{\cdot-}$ възстановява нитроксидния радикал, дават основание за провеждане по нататък на изследвания, свързани с проследяване динамиката на нитроксид-усиленият MRI сигнал, която е резултат от редукцията/окислението на нитроксидните производни и всъщност би могла да се използва за визуализиране на свръхпродукция на $O_2^{\cdot-}$ в организма. Например при изследване кинетиката на нитроксид-усиления MRI сигнал в мозъчна тъкан на здрави мишки и мишки с невробластома при използване на окислената (радикаловата) или редуцираната (хидроксиламина) форма на SLENU и TEMPOL се установяват разлики, които демонстрират наличие на повече редуциращи еквиваленти в здравата тъкан в сравнение с туморната. Изследвана е също динамиката на нитроксид-усиленият MRI сигнал при експериментален модел на колоректален карцином, като е установена разлика в интензитета на сигнала във вътрешността (ядрото) и периферията на тумора, след инжеектиране на SLENU. Проследена е и динамиката на MRI сигнала при експериментални модели на невробластома и глиома – в ранен и напреднал стадий на развитие на тумора. Получените резултати са верифицирани чрез *ex vivo* ЕПР спектроскопия. Направено е обобщение, че раковите клетки се характеризират едновременно с повишени нива на окислители и редуктори (в сравнение с нормалните), като балансът между окислителите и редукторите е в полза на първите и че сравнителният анализ на резултатите, получени чрез двете имиджинг техники, ще доставя максимално точна информация за клетъчния/тъканния редокс-статус.

Подобни експерименти чрез използване на MRI и нитроксидните радикали mito-TEMPO, Methoxy-TEMPO и TEMPOL са проведени с цел визуализиране на свръхпродукция на супероксид в допаминергичната област на мозъка на мишки с експериментален модел на паркинсонизъм. Резултатите от това изследване показват, че Methoxy-TEMPO и TEMPOL не дават възможност за ясно визуализиране на оксидативните процеси, протичащи в допаминергичните неврони на мишките с паркинсонизъм за разлика от mito-TEMPO, който се оказва подходяща редокс-чувствителна контрастна субстанция (редокс-сензор) за визуализиране на митохондриална дисфункция, съпроводена със свръхпродукция на

супероксид в допаминергичната област на мозъка на мишки с паркинсонизъм, чрез използване на MRI.

Изследвана е също и възможността чрез подходящи нитроксиди и използване на MRI и EPR спектроскопия *in vitro* да се визуализира и оцени редокс-статуса, в изолирани клетъчни линии (ракови и неракови) преди и след индуциране на оксидативен стрес чрез системата 2-метоксиестрадиол/ротенон. Чрез MRI и EPR спектроскопия и подходящо подбрани моделни безклетъчни системи са изследвани молекулните механизми, отговорни за динамиката на контрастните свойства на използваните нитроксиди. На база на тези изследвания е предложен нов методичен подход за оценка на редокс-статуса, с използване на кислород-центрираните нитроксидни радикали *mito-TEMPO* и *methoxy-TEMPO* като редокс-сензори. Разработеният EPR метод е валидизиран с конвенционални аналитични тестове, доказващи праяката роля на супероксидните радикали в динамиката на контрастните свойства на нитроксидите в клетъчните суспензии и освен това е приложим върху изолирани клетъчни и тъканни препарати, и е подходящ за диагностика на патологични състояния.

Оценка на приносите

Въз основа на компетентно и задълбочено обсъждане на резултатите са направени **9** извода и са посочени **8** приноса. Изводите отразяват адекватно основните резултати в дисертационния труд. Всички приноси са с оригинален характер, като **7** от тях имат и приложен характер.

Оценка на публикациите във връзка с дисертационния труд

Във връзка с темата на дисертационния труд са публикувани **23** статии и **2** са приети за печат. **20** от статиите са в списания с импакт-фактор, като в **15** статии доц. Желев е първи автор. **3** резюмета са публикувани в списания с импакт-фактор. Общий импакт-фактор на публикациите по дисертацията е **74.85**. Представен е списък на **102** цитирания и **15** отзива в пресата, които са за последните **6** години. Всички работи са публикувани в периода от 2009 г. до 2016 г. Доц. Желев е бил ръководител на **3** научни проекта свързани с темата на дисертацията, като **2** от тях са финансиирани от японски научни фондове и **1** от ФНИ на ТрУ.

Оценка на автореферата

Представеният *Автореферат* е структуриран съгласно изискванията и отразява напълно проведените изследвания и получените резултати, описани в дисертацията.

Критични бележки

Искам да отправя и някои критични бележки.

1. Някои от формулировките на изводите са доста обширни, което до известна степен е свързано с големия брой данни и констатации, но все пак биха могли да се представят и по-кратко.

2. Трябва да се отбележат и някои неточности и неясноти свързани с определяне на LD50 стойности на двете нитроксид съдържащи нитрозоури. На стр. 90 например за SLCNUgly е посочено, че тази доза е 125 mg/kg, а за SLENU – 100 mg/kg. Би трябвало да е обратното, а защото SLENU е синтезирана, като съединение с антиоксидантна активност, и ниска обща токсичност свойства, които вече не еднократно са доказани и практически не притежава антитумора активност за разлика от SLCNUgly, която поради наличието на хлоретиловия (-CH₂-CH₂-Cl) остатък проявява висока антилевкемична и антимеланомна активност *in vivo* в тумор-носещи мишки (L1210 и B16 меланом, съответно), но проявява токсичност и при здрави мишки. Разбира се, тази токсичност спрямо здрави животни е по-ниска от аналога и клиничният антиканцероген препаратор CCNU, именно поради наличието на нитроксидната структура в нея. Относно LD50 на SLCNUgly за мишки в една наша публикация от 2008 г. сме посочили тя е 113.8 mg/kg. Като се има предвид, че LD50 в двата случая е определяна при различни линии мишки и ако е налице и разлика в чистотата на съединението, би могла да се допусне известна разлика в стойността при определяне на LD50.

3. По нататък на стр. 91 се заявява, че „всички *in vivo* експерименти с мишки от линията C57Bl/6 са проведени при концентрация на нитроксид съдържащите нитрозоури **0.4 mmol/kg b.w.**, което гарантира, че се работи с доза под LD50 за съответния нитроксид”. Ако обаче това количество се изчисли например за една мишка с тегло 30 g, се вижда, че се падат по **4.35 mg** на мишка. Предвид факта, че за LD50 на SLCNUgly в дисертацията е посочена 125 mg/kg, то дозата за мишка със същото тегло би трябвало да е **3.75 mg**. От тук става очевидно, че при SLCNUgly се е работило с доза, която е по-висока от LD50, а не под нея, както се твърди на стр. 91.

Заключение

В работата са използвани над **10** нитроксидни производни, различаващи се по своите химични и биологични свойства като структура, резистентност на редукция, степен на хидрофобност, степен на проникване през клетъчната мембра на, специфично локализиране във вътреклетъчни органели (например, митохондрии) и др. характеристики. Оригинален е подходът за използване на нитроксиди в две форми – парамагнитна (контрастна) и диамагнитна/хидроксиламинна (неконтрастна), като в първия случай се анализира затихването на MRI/EPR сигнала в резултат на редукцията на нитроксидния радикал, а при втория случай се анализира появата на нитроксид-усилен MRI/EPR сигнал в резултат на взаимодействието на хидроксиламинната форма със супероксидните радикали и възстановяване на контрастната парамагнитна форма на нитроксида. Установена е висока степен на корелация между получените резултати от двата подхода. Проведеният систематичен подход, за доказване на научните хипотези, изложени в дисертационния труд,

демонстрира възможната бъдеща приложимост на нитроксидите, като ценен инструмент за нуждите на образната диагностика и биомедицинските изследвания.

Разработени са няколко методични подхода с използване на нитроксидни радикали в *in vitro* и *in vivo* системи, които се характеризират с висока степен на оригиналност и са описани в приносите към дисертацията. Голяма част от получените резултати са публикувани за първи път в литературата от автора доц. Желев. В края на автореферата са представени и отзиви в чуждестранния печат.

Като се има предвид, че в катедра Химия биохимия, МФ, Тр. У-тет, тематиката свързана с нитроксидни радикали, нитроксид-съдържащи нитрозоуреи и изследване на техните физико-химични и биологични свойства и търсене на практическото им приложение стартира преди повече от 25 години е очевидно, че идеята за нитроксидните радикали, свойствата им и тяхното практическо приложение не е остаряла, напротив тя е съвсем актуална и перспективна, и продължава да се развива, което е видно и от представения от доц. Желев дисертационен труд.

Дисертационният труд и авторефератът представени от доц. Желев са в завършен вид и отговарят напълно като качество, обем и наукометрични показатели на изискванията на ЗРАСРБ, както и на Правилника и критериите на Тракийския университет за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Всичко това ми дава основание, напълно убедено да препоръчам на уважаемото специализирано научно жури, да гласува положително за присъждане на научната степен “доктор на науките” на доц. Живко Желязков Желев.

12.06.2017 г.



.....
/Проф. д-р Антоанета Желева/