

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Физически факултет

Катедра „Физика на кондензираната материя“

ДЕСИСЛАВА АНРИ ЛАЗАРОВА

**КОНТРАСТ-УСИЛЕНИ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНИ
ТЕХНИКИ ЗА ВИЗУАЛИЗИРАНЕ НА ПАТОЛОГИИ,
СВЪРЗАНИ С НАРУШЕНИЯ В КЛЕТЪЧНИЯ РЕДОКС-
СТАТУС**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Професионално направление: 4.1 Физически науки

Научна специалност: Биофизика

София, 2019

Експерименталните изследвания по настоящия дисертационен труд са проведени в Националния институт за радиологични изследвания (NIRS) на Япония, Чиба, Япония.

Дисертационният труд се състои от 95 страници и съдържа 39 фигури и 1 таблица. Използвани и цитирани са 144 литературни източника.

Авторът е докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Физика на кондензираната материя”, Физически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертацията е обсъдена на разширен Катедрен съвет на катедра „Физика на кондензираната материя”, Физически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ на 10.01.2019 г.

Членове на научно жури:

1. Акад. Проф. дфзн Борис Тенчов – рецензент
2. Доц. д-р Албена Йорданова – рецензент
3. Доц. д-р Биляна Николова – становище
4. Доц. д-р Георги Хаджидеков – становище
5. Доц. д-р Тамара Пайпанова – становище

Публичната защита ще се състои на 18. 04. 2019 г., от 11.00 часа във Физически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Деканата на Физически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, стая А421.



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Физически факултет

Катедра „Физика на кондензираната материя“

Десислава Анри Лазарова

**Контраст-усилени магнитно-резонансни техники за
визуализиране на патологии, свързани с нарушения
в клетъчния редокс-статус**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Професионално направление: 4.1 Физически науки

Научна специалност: Биофизика

Научни ръководители:

Проф. дбн Румяна Бакалова-Желева

Доц. Геновева Златева, дф

София, 2019

Изказвам своята най-искрена благодарност и признателност към научните си ръководители проф. дбн Румяна Бакалова и доц. Геновева Златева, дф за помощта, съветите и отделеното време. Благодарение на тяхната подкрепа и доверието им в мен, реализирането на настоящия дисертационен труд стана възможно.

Благодаря на моето семейство – Габриела, Младен и майка ми за търпението, разбирането и подкрепата.

Списък на използвани съкращения

DCF	дихлородихидрофлуоресцеин
DHE	дихидроетидиум
DIW	дейонизирана вода
DMSO	диметилсулфоксид
EPR	електрон-парамагнитен резонанс
GSH/GSSG	глутатион (редуцирана/окислена форми)
HDL	липопротеини с висока плътност
LDL	липопротеини с ниска плътност
MPTP	1-метокси-4-фенил-1,2,3,6-тетрахиdropиридин
MRI	магнитно-резонансен имиджинг (томография)
NAD ⁺ /NADH	никотинамид-аденин-динуклеотид (окислена/редуцирана форми)
NADP ⁺ /NADPH	никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (окислена/редуцирана форми)
PBS	буфериран физиологичен разтвор
PET	позитрон-емисионна томография
PROXYL	нитроксид от пиролидинов тип
RE	редуциращи еквиваленти
ROI	област на интерес
ROS	реактивни кислородни форми
SNpc	„ <i>substantia nigra pars compacta</i> ”
SOD	супероксид-дисмутаза
SPECT	едно-фотонна емисионна компютърна томография
TEMPO	нитроксид от пиперидинов тип
КМБ	кръвно-мозъчна бариера
ЯМР	ядрен магнитен резонанс

ВЪВЕДЕНИЕ

Редокс-статусът на биологични обекти (клетки, тъкани, телесни течности) се определя от баланса между ендогенните редокс-активни компоненти: окислителители (активни форми на кислорода и азота) и редуктори (антиоксидантни системи, тиол-съдържащи белтъци, ендогенни редокс-двойки и др.). Съотношението между ендогенните окислителители и редуктори обуславя регулацията на клетъчната сигнализация в организма, поддържаща клетъчната хомеостаза в нормални граници. Нарушаването на редокс-баланса в клетките, тъканите и телесните течности е в тясна взаимовръзка с патогенезата на много заболявания: канцерогенеза, невродегенеративни и автоимунни заболявания, атеросклероза, възпалителни процеси и др.

Доскоро редокс-процесите оставаха скрити от пряко наблюдение в живите системи, поради липсата на адекватна методология. През последните години е постигнат сериозен напредък в селективната локализирана детекция на много редокс-активни компоненти (различни видове ROS, различни ендогенни редокс-двойки, антиоксидантни ензими, неензимни антиоксиданти и др.) на клетъчно, тъканно и дори организмово ниво (Zhelev et al., 2009; Kalyanaraman et al., 2012; Dikalov & Harrison, 2014; Basic et al., 2016; Maulucci et al., 2016). Разработени са нови генетично кодирани или синтетични редокс-сензори – контрастни субстанции с редокс-чувствителност и таргетно насочени, които правят възможна оценката на редокс-статуса в организма. Усъвършенстват се и техниките за визуализиране на тези сензори и в някои случаи за определяне количествено на окислително-редукционните процеси в живите клетки, най-вече на основата на флуоресценция, ултразвук, хемилуминесценция, нуклеарни методи (PET, SPECT), магнитно-резонансни методи – електронен-парамагнитен резонанс (EPR) и магнитно-резонансен имиджинг (MRI).

Най-новите тенденции в тези изследвания са насочени към имиджинг, при който се реконструират изображения, позволяващи картографиране на редокс-статуса на тъканите и органите в интактни организми. Чрез този иновативен подход става възможно проследяването на прогресията на заболяванията, съпътствани с оксидативен стрес и нарушена редокс-сигнализация; профилактиката и контролирането им в хода на тяхната терапия; прогнозирането на ефективността от терапията и планиране на терапевтичната стратегия – изключително важни фактори в съвременната персонализирана медицина.

Изследванията върху действието на редокс-сензори с различна модалност показват редица предимства и недостатъци, които ги правят

повече или по-малко подходящи за изследвания на редокс-статуса на биологичния обект. Най-подходящата контрастна субстанция за редокс-сензор би следвало да отговаря на някои основни условия, а именно: да прониква през клетъчните мембрани и по възможност, през кръвно-мозъчната бариера (КМБ); да дава информация за баланса между вътреклетъчните окислителни и редуценти, респ. за общия редокс-статус на клетките и тъканите, а не само за статуса на отделен редокс-активен компонент (окислена/редуцирана форми); да бъде нетоксична или нискотоксична, с оглед на прилагането ѝ *in vivo*; да се екскретира бързо от организма; да се характеризира с висок контраст и възможности за визуализиране с висока чувствителност и резолюция. (Желев, 2017).

Изследванията показват, че в смисъла на изброените по-горе свойства на идеалните редокс-сензори, едни от най-атраktivните редокс-чувствителни контрастни субстанции са цикличните нитроксидни радикали, които могат да бъдат регистрирани и анализирани *in vitro* и *in vivo* чрез различни магнитно-резонансни техники (Soule et al., 2007; Likhtenshtein et al., 2008; Dikalov & Harrison, 2014; Bacic et al., 2016, Желев, 2017).

Регистрирането на супероксидния радикал ($O_2^{\cdot-}$ – една от основните и най-интересни сигнални молекули в живи обекти) и хидроксилния радикал ($\cdot OH$) с EPR е твърде ограничено, тъй като те са много краткоживущи, за да бъдат регистрирани чрез конвенционален EPR на експериментални животни и на хора. Това налага при детекция на ROS с EPR да се използват подходящи спин-сонди (каквито са нитроксидите). EPR анализите на редокс-статуса на биологични обекти се извършват преди всичко *in vitro* (на моделни и клетъчни системи). Приложението на тази магнитно-резонансна техника *in vivo* е все още твърде ограничено, поради ниската резолюция на съществуващата апаратура.

MRI позволява да се получат висококачествени анатомични изображения – в отсъствие и в присъствие на екзогенни контрастни субстанции, тъй като се базира главно на промените в ориентацията на спина на водните протони, които са в изобилие в живия организъм. Динамиката на MRI сигнала с използване на нитроксидна спин-сонда служи не само за проследяване на нейната фармакокинетика, но може да бъде и индикатор за редокс-статуса на изследвания биологичен обект. Редокс-имиджингът е един от най-новите и перспективни подходи в експерименталната образна диагностика, а също и в клиничната практика като позволява чрез нитроксид-усиленият MRI да се разширят възможностите за функционална образна диагностика.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертацията:

Да се разработят контраст-усилени магнитно-резонансни методи за визуализиране на патологии, свързани с нарушения на клетъчния редокс-статус.

Основни задачи:

I. Изследване на ефекта на ендогенни окислители и редутори върху нитроксид-усиления MRI/EPR сигнал на моделни безклетъчни системи.

II. Прилагане на нитроксид-усилен EPR за визуализиране и оценка на клетъчния редокс-статус на изолирани клетъчни линии (с различна степен на пролиферация и диференциация) *in vitro*. Верифициране на резултатите чрез конвенционални аналитични тестове за детекция на супероксид, хидропероксиди и общ редуциращ капацитет на клетъчни суспензии.

III. Изследване на възможността за визуализиране на тъканния редокс-статус при мишки с експериментален модел на хиперхолестеролемиа, чрез използване на MRI и mito-TEMPO като контрастна субстанция. Прилагане на нитроксид-усилен MRI за оценка на ефекта на антилипидемични лекарствени средства (холестирамин) върху изследвания модел. Сравнителен анализ между животни, отглеждани на нормална диета и животни, отглеждани на холестеролова диета (в отсъствие и присъствие на холестирамин).

IV. Изследване на възможността за визуализиране на тъканния редокс-статус в кортекса и допаминергичната област на мозъка на мишки с експериментален модел на паркинсонизъм, чрез използване на MRI и нитроксиди като контрастни субстанции.

Сравнителен анализ между здрави животни и животни с паркинсонизъм.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Клетъчни линии: Използвани са нормални и ракови клетъчни линии.

Експериментални животни: Всички животни, използвани за проведените експерименти са отглеждани в лицензиран вивариум при стерилни условия, намиращ се на територията на Националния институт за радиологични изследвания на Япония (гр. Чиба). Експериментите с животни са проведени с разрешението на *Animal Care and Use Committee* на същия институт.

Моделни безклетъчни системи: (1) KO₂/дейонизирана вода – чиста химична система за генериране на O₂^{-•}; (2) H₂O₂/дейонизирана вода; (3) нитроксид/KO₂/дейонизирана вода; (4) нитроксид/H₂O₂/дейонизирана вода.

Култивиране на ракови клетки: Клетъчните линии се отглеждат в инкубатор при 37°C и влажна атмосфера, с 5% CO₂. Адхезивните клетки се култивират в клетъчна среда DMEM, съдържаща 10% термално инактивиран FBS, 100 µg/mL стрептомицин и 100 U/mL пеницилин.

Изолиране на кръвна плазма: Кръвните проби се взимат от опашна вена на мишка, като за целта се използват хепаринизирани полиетиленови тръбички (PE10; *Intramedic, Becton Dickinson*) и спринцовки.

Изолиране на липопротеинови фракции от кръв: За изолиране на липопротеинови фракции (LDL и HDL) от кръвна плазма се използва *LDL/VLDL & HDL Purification kit (Ultracentrifugation Free) (Cell Biolabs Inc.)*.

Експериментален модел на хиперхолестеролемия в мишки: За разработване на експериментален модел на хиперхолестеролемия се използват мишки (мъжки) от линията *C57Bl/6*. До 5^{та} седмица от раждането им, мишките се отглеждат на нормална диета (*MF; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan*). В началото на 6^{та} седмица животните се поставят на диета с високо съдържание на холестерол (*ATT6492210; 1.25% (w:w) холестерол; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan*; без холестирамин или с 3% холестирамин) и се отглеждат при този режим на хранене в продължение на 20 седмици, в неръждаеми клетки, вода *ad libitum*, 12-часов цикъл светло/тъмно. Контролната група е от мишки от същата линия, които се отглеждат по същия протокол на нормална диета.

Експериментален модел на болестта на Паркинсон в мишки: При разработване на експериментален модел на болестта на Паркинсон (паркинсонизъм) се използват мишки (мъжки) от линията *C57Bl/6*, на възраст между 10 и 12 седмици (28±2 g), третирани с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин (MPTP), по метода на (Jackson-Lewis & Przedborski, 2007), отглеждани на стандартна диета и вода *ad libitum*, при 12-часов цикъл светло/тъмно.

Метилтетразолиум тест (MTT/MTS) за виталитет на клетки: Използва се *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega)*. Принципът на метода се базира на биоредукцията на тетразолиевата сол 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) от живи клетки до формазанов продукт, който се регистрира спектрофотометрично.

Оцветяване с трипаново синьо: Принципът на метода се основава на проникването на багрилото трипаново синьо през клетъчната мембрана на мъртвите клетки и тяхното оцветяване. Това дава възможност за отдиференцирането им от живите клетки, чиито плазмени мембрани са непроницаеми за багрилото. Измерванията се извършват с автоматичен брояч на клетки "*Countess® Automated Cell Counter*" (*Invitrogen*), на принципа на светлинната микроскопия.

Анализ на общия антиоксидантен (редуциращ) капацитет на биологични проби: За анализ на общ антиоксидантен (редуциращ) капацитет на биологични проби се използва *OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay kit (Cell Biolabs, Inc.)*. Методът се базира на редукцията на Cu^{2+} до Cu^+ от редуциращите еквиваленти в биологичната проба и взаимодействието на Cu^+ с хромофор, с последваща спектрофотометрична детекция.

Дихидроетидиум DHE-тест за анализ на супероксид: DHE е една от най-широко използваните флуорогенни сонди, която прониква през плазматичната мембрана на живите клетки и взаимодейства с вътреклетъчния супероксид с висока степен на селективност, в резултат на което се получава флуоресциращ продукт (Budd et al., 1997; Peshavariya et al., 2007). Взаимодействието на DHE със $\text{O}_2^{\cdot-}$ води до образуване на 2-хидроетидиев катион (2-OH-E⁺), който флуоресцира в червената област на спектъра.

Дихидродихлорофлуоресцеинов DCF-тест за анализ на хидроперокси: За анализ на вътреклетъчните хидроперокси се използва *OxiSelect™ In vitro ROS Assay kit (Green Fluorescence) (Cell Biolabs, Inc., US)*. 2,7-дихидрофлуоресцин-диацетат (DCFH-DA) е флуорогенна сонда за откриване на вътреклетъчен H_2O_2 и анализ на оксидативен стрес (Nempel et al., 1999; Bonini et al., 2006; Karlsson et al., 2010). DCFH-DA е клетъчно-проницаем естер, който се хидролизира в клетката до дихидрокси-DCFH и след двуелектронно окисление на DCFH води до формиране на флуоресцентен продукт – 2',7'-дихлоро-дихидрофлуоресцеин (DCF). Интензитетът на флуоресценция на DCF е пропорционален на нивото на водородния пероксид (респ. хидропероксидите) в клетките.

Анализ на общия холестерол и HDL-холестерола в кръвна плазма: Количеството на холестерола в кръвната плазма и HDL се определя по метода на холестерол-оксидазата, като за целта се използва *Total Cholesterol Assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Japan)* или *Cell Biolabs, Inc.)* и *HDL-Cholesterol Assay kit (Cell Biolabs, Inc.)*. Анализът дава възможност да се отчете едновременно количеството на свободния холестерол и холестероловите естери.

Тест за глюкозна консумация: Глюкозната консумация се определя, като от началната стойност глюкозна концентрация в биологичната проба се извади концентрацията, отчетена след 24 часа чрез дигитален глюкометър. Данните се нормират към брой клетки за всяка времева точка.

Хистохимичен анализ: Изолираните органи от мишка се фиксират с 4% формалдехид в PBS за една нощ. Тъканите се парафинизират и се правят срези, които се оцветяват с хематоксилин и еозин. Оцветените тъканни срези се анализират с микроскоп „*Olympus FV1000*” (*Olympus, Japan*).

EPR спектроскопия на клетъчни суспензии *in vitro*: EPR спектърът на нитроксидния радикал се измерва чрез “*X-band EPR Spectrometer*” (*JEOL, Japan*), снабден с кухина за измерване в TE-режим („Transverse Electric mode“). Капилярката се позиционира в центъра на кухината с прободържател. Измерванията се извършват при следните параметри: микровълнова честота – 9.4 GHz; индукция на магнитното поле – 336 mT; микровълнова мощност – 2.0 mW; модулираща честота на полето – 100 kHz; модулираща амплитуда на полето – 0.063 mT; времева константа – 0.01 sec; спектрален прозорец – 10 mT; време на скениране – 1 min. EPR спектрите на стандартните разтвори на нитроксидите в PBS се използват като контроли.

MRI измервания: MRI измерванията са проведени на 7.0 T MRI с хоризонтален магнит (*Kobelco & Jastec, Japan*), свързан към *Bruker Avance* конзола (*Bruker BioSpin, Germany*) и контролиран софтуерно чрез *ParaVision 4.0.1*. (*Bruker BioSpin, Germany*).

Скениранията на моделни системи се осъществяват при следните параметри: T_1 – време на спин-решетъчна релаксация (некохерентна секвенция на градиентно ехо, съдържаща импулс (FLASH), унищожаваш остатъчната намагнитеност, след градиента на прочит), TR – репетиционно време (интервал разделящ последователните възбуждания на спиновете) = 250 ms; TE – ехо време = 9.6 ms; FA – ъгъл на люлеене = 180° ; FOV – поле на реконструкция = 5.2×4.0 cm; матрица – 64×64; NA – брой на усредняванията = 4; време на скениране = 19.2 s; дебелина на среза – 2 mm.

При модела на хиперхолестеролемия (1) и болестта на Паркинсон (2) се използва следният режим на скениране: T_1 – време на спин-решетъчна релаксация (некохерентна секвенция на градиентно ехо, съдържаща импулс (FLASH), унищожаваш остатъчната намагнитеност, след градиента на прочит), TR – репетиционно време (интервал разделящ последователните възбуждания на спиновете) = 75 ms; TE – ехо време = 3.2 ms (1) и 5.135 ms (2); FA – ъгъл на люлеене = 45° ; FOV – поле на реконструкция – 1.92×1.92 cm²; матрица – 64×64 (1) и 128×128 (2); NA – брой на усредняванията = 4; време на скениране = 19.2 s; дебелина на среза – 1.5 mm (1) и 0.5 mm (2); брой на срежите – 5 (1) и 2 (2).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

I. Изследване на ефекта на ендогенни окислителни и редуктори върху нитроксид-усиления MRI/EPR сигнал на моделни безклетъчни системи.

В зависимост от степента на хидрофобност на нитроксидните субстанции и, респективно, тяхното проникване или не в клетките, се

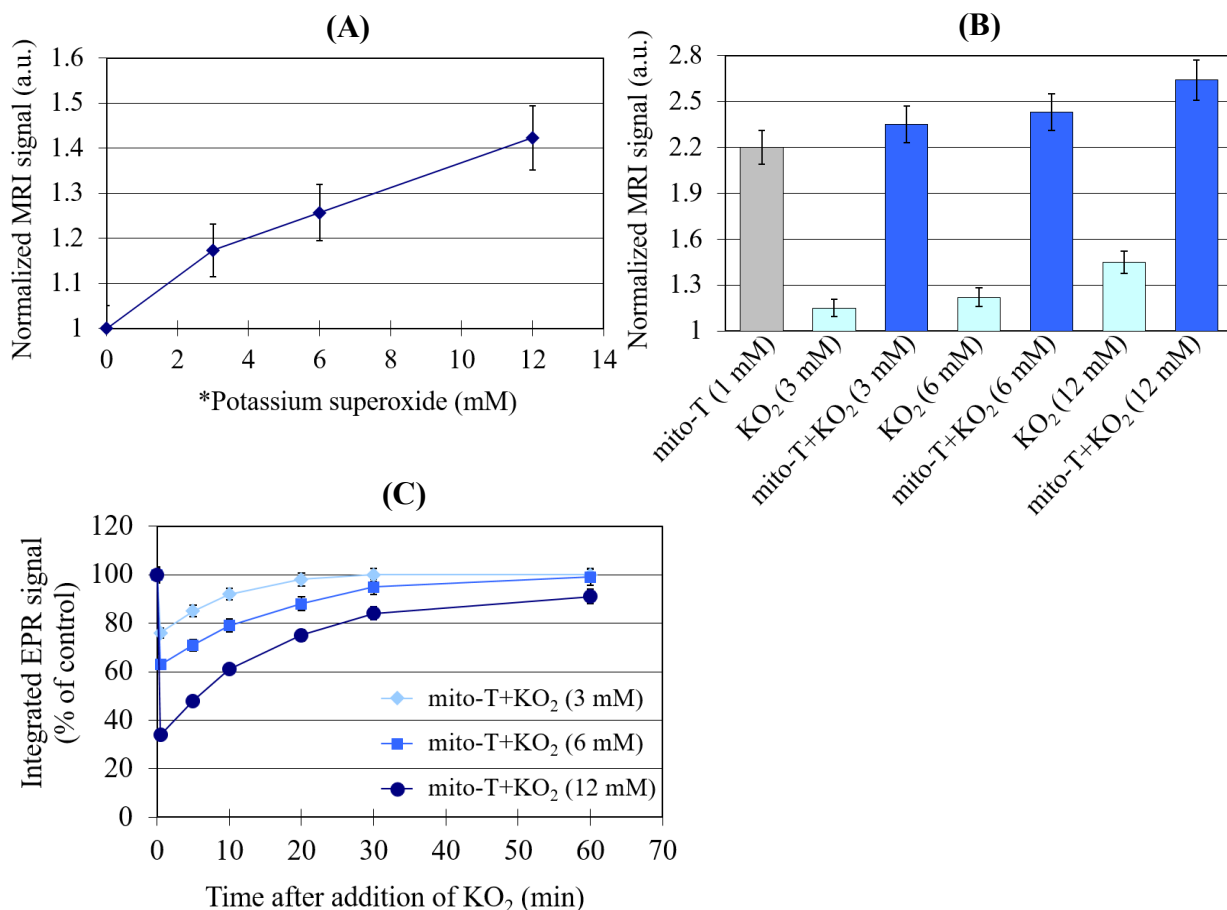
определя и приложението им за изследване на редокс-статуса на биологични обекти. Например, водоразтворимите контрастни нитроксиди са подходящи за изследване на редокс-статус на телесни течности, докато хидрофобните такива – за редокс-статус на клетки и тъкани *in vitro* и *in vivo* (Желев, 2017). Доколкото целта в настоящата работа е изследване на клетъчни линии и тъкани с нитроксид-усилени магнитно-резонансни техники, са подбрани хидрофобни нитроксиди, лесно проникващи през мембраната. В настоящия раздел е използвана спин-сондата mito-TEMPO като контрастна субстанция. Молекулата му е изградена от TEMPO – цикличен нитроксид от пиперидинов тип, с включена трифенилфосфониева група, която позволява проникването му през клетъчната мембрана и локализиране предимно в митохондриите (Dikalov & Harrison, 2014).

За изясняване ефекта на супероксидния радикал и водородния пероксид върху редокс-цикъла на цикличните нитроксиди и T_1 -времето на релаксация на водните протони при MRI и интензитета на сигнала при EPR спектроскопия, са направени изследвания върху моделни безклетъчни системи: (1) калиев супероксид в дейонизирана вода – система за генериране на супероксид, с и без mito-TEMPO; (2) водороден пероксид в дейонизирана вода с и без mito-TEMPO; (3) калиев супероксид в дейонизирана вода с mito-TEMPOH (неконтрастна хидроксиламинна форма на mito-TEMPO) (Фигури 1 ÷ 3).

Усилването на MRI сигнала в присъствие на парамагнитно обкръжение (в частност свободни радикали) се дължи на намаляване на T_1 времето на релаксация на протоните (Lurie, 2003; Köhler, 2011), в резултат на електрон-протонни взаимодействия.

От резултатите, представени на Фигура 1А се вижда, че парамагнитният супероксид увеличава интензитета на MRI сигнала и това усилване нараства с повишаване на концентрацията на калиевия супероксид. Това показва, че механизмът на усилването на MRI сигнала не е свързан с биохимични процеси, а е физичен (Lurie, 2003). Използваните изходни концентрации на калиев супероксид са 3, 6 и 12 mM. Поставен във водна среда, калиевият супероксид се разпада сравнително бързо до супероксидни радикали, които от своя страна претърпяват бърза дисмутация до водороден пероксид (Kishioka et al, 2004). Следователно, в хода на подготовка на MRI измерването (около 10-15 min до старта на скенирането) концентрацията на супероксидни радикали във фантомите намалява неколкратно и достига микромолярни и дори наномолярни стойности (Getsov et al, 2018). Тези концентрации са съизмерими с нивата на супероксид в клетките и тъканите при редица физиологични процеси (напр. имунен отговор, синтез на АТФ *de novo* в

синапса, невротрансмисия) и патологични състояния (напр. тумори, невродегенеративни и атерогенни увреждания, хипоксични огнища, възпалителни огнища) (Kishioka et al, 2004). Това е косвено доказателство, че *свръх-продукцията на супероксид* в организма може да бъде регистрирана с T₁ MRI при подходящ подбор на секвенциите за скениране и усилване на контраста. Този параметър има потенциала да бъде нов диагностичен маркер в образната диагностика.



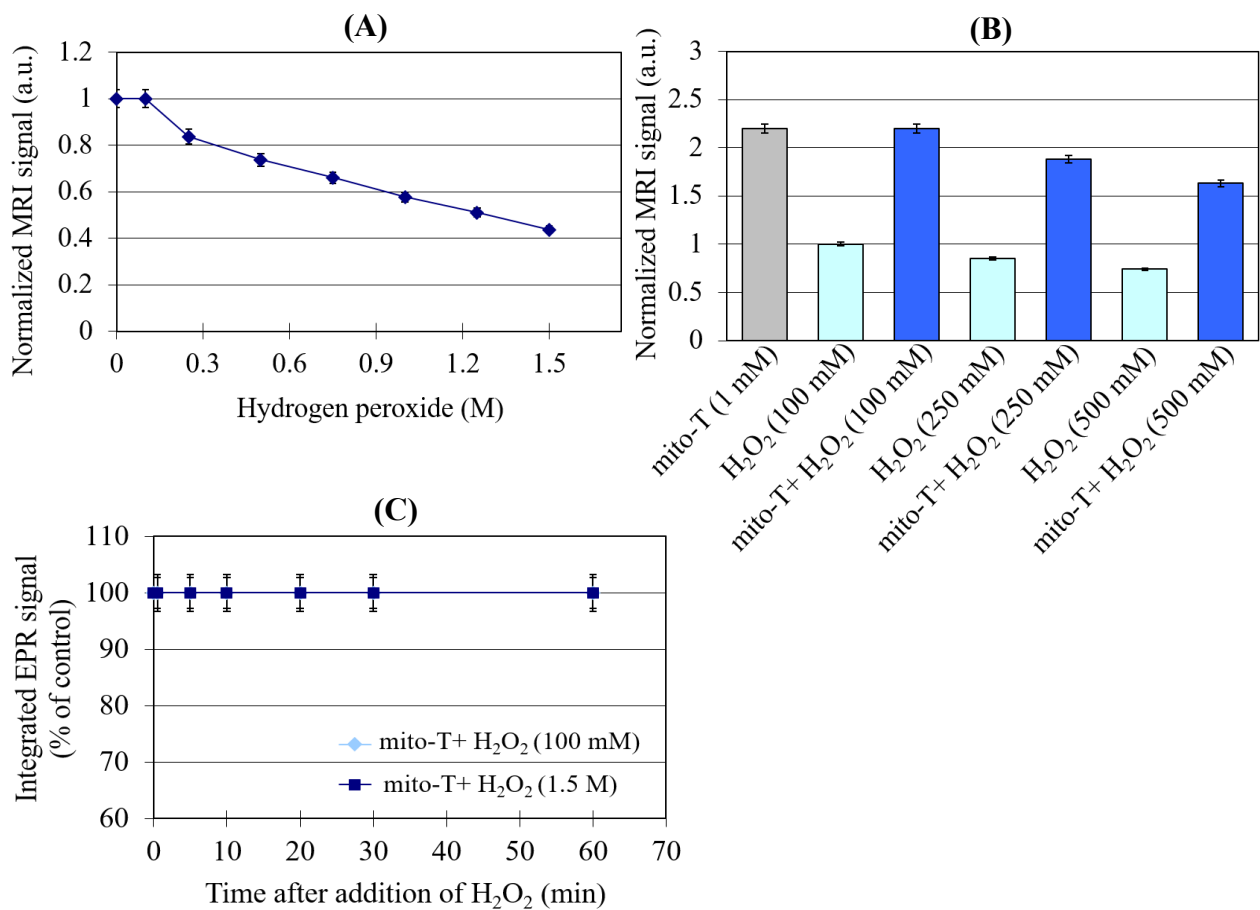
Фигура 1. (A) Ефект на супероксида върху T₁ времето на релаксация на дейонизирана вода (DIW) (gradient-echo MRI). MRI сигналът е получен на фантоми, съдържащи различни концентрации калиев супероксид в дейонизирана вода – система за генериране на супероксид. (B) Ефект на калиевия супероксид върху T₁ времето на релаксация на водните протони – в отсъствие и присъствие на mito-TEMPO (mito-T) (gradient-echo MRI). MRI данните са получени на фантоми, съдържащи една и съща концентрация mito-TEMPO (1 mM) и различни изходни концентрации калиев супероксид. Забележка за (A) и (B): *Времето между разтварянето на калиевия супероксид в дейонизирана вода и началото на MRI измерванията е ~10 min. Затова, реалната концентрация на калиевия супероксид в системата води до много по-малки концентрации на супероксид (в μM) при стартиране на MRI измерването. Причината за това е предположението, че калиевият супероксид се разлага веднага и напълно до супероксиден радикал, който от своя страна се превръща във водороден пероксид със скоростна константа на реакцията ~10⁵ M⁻¹.s⁻¹ (Kishioka et. al., 2004). Данните са

обработени със софтуер *ParaVision*. (С) Динамика на интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO (1 mM) в присъствие на калиев супероксид в различни концентрации. Всички данни са измерени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

При комбинация на mito-TEMPO с калиев супероксид се наблюдава адитивен ефект – увеличаване на MRI сигнала над този на нитроксида, пропорционално на увеличаването на концентрацията на калиевият супероксид (Фигура 1B).

На Фигура 1C е представена в динамика промяната на интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO (1 mM) в присъствие на калиев супероксид в различни концентрации. Непосредствено след смесване на контраста и водния разтвор на калиев супероксид, първоначално EPR сигналът намалява, а впоследствие се наблюдава почти пълно възстановяване до изходното ниво за 60 минути. От фигурата е видно, че степента на намаляване на интензитета е по-голяма при по-висока концентрация на калиев супероксид. Резултатите биха могли да бъдат обяснени с превръщанията на нитроксидните радикали, съгласно редокс-цикъла им, а именно, намаляване на нитроксида поради трансформацията му в диамагнитните форми – оксоамониев йон и хидроксиламин, и респективно, намаляване на EPR сигнала. Последващото възстановяване на контрастната радикалова форма се дължи на окисление на хидроксиламинната форма от супероксида, което се съпътства с увеличаване на интензитета на сигнала до почти пълното му възстановяване за периода на измерванията (Zhelev et al., 2013).

На Фигура 2 са представени резултати за ефекта на водородния пероксид с и без mito-TEMPO върху T_1 MRI сигнала на водородните ядра в състава на водата, както и върху интензитета на EPR сигнала на спинсондата. Използваните концентрации на водороден пероксид са от 0 до 1.5 M. За разлика от супероксида, водородният пероксид понижава интензитета на MRI сигнала (респективно увеличава T_1 -времето на релаксация), особено при високи концентрации. При концентрации, по-големи от 0.1 M, водородният пероксид значително намалява интензитета на нитроксид-усиления MRI сигнал при фантомните проби с mito-TEMPO (Фигура 2B). Физиологичните концентрации в клетките, тъканите и телесните течности обаче, са в пъти по-ниски от тези, при които се наблюдава понижаване на сигнала (до около 1 mM). При нормални ендогенни нива на водороден пероксид промени в T_1 -времето на релаксация не се наблюдават. Водородният пероксид е много стабилен на разпад в дейонизирана вода и концентрацията му във фантомите при старта на скенирането е аналогична на началната.



Фигура 2. (A) Ефект на водородния пероксид върху T_1 времето на релаксация на дейонизирана вода (DIW) (gradient-echo MRI). MRI сигналът е получен на фантомни проби, съдържащи различни концентрации водороден пероксид в дейонизирана вода. (B) Ефект на водородния пероксид върху T_1 времето на релаксация на водните протони – в отсъствие и присъствие на mito-TEMPO (mito-T) (gradient-echo MRI). MRI данните са получени на фантоми, съдържащи една и съща концентрация mito-TEMPO (1 mM) и различни концентрации водороден пероксид. Данните са обработени със софтуер *ParaVision*. (C) Динамика на интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO (1 mM) в присъствие на водороден пероксид в различни концентрации. Всички данни са измерени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

Намаляването на MRI сигнала при високи концентрации на водороден пероксид може да се дискутира във връзка с взаимодействия, които са характерни за механизма на ЯМР в този случай. Известно е, че условието за ядрен магнитен резонанс е различно за свободни атомни ядра и за същите тези ядра, включени в състава на атоми и молекули, поради различното им обкръжение. Магнитните моменти на заобикалящите резониращите ядра електрони и други ядра, повлияват магнетизма на ядрата, като променят резонансната честота и, съответно, линията на поглъщане в спектъра на ЯМР се отмества – „химично отместване“. Получаването на MRI сигнала, представен на фигурите, е на базата на

резонанс на водородните ядра (протоните), главно в състава на водните молекули, т. е. условията за резонанс ще отчитат химичното отместване на тези ядра. Протоните в състава на водородния пероксид имат друго химично отместване.

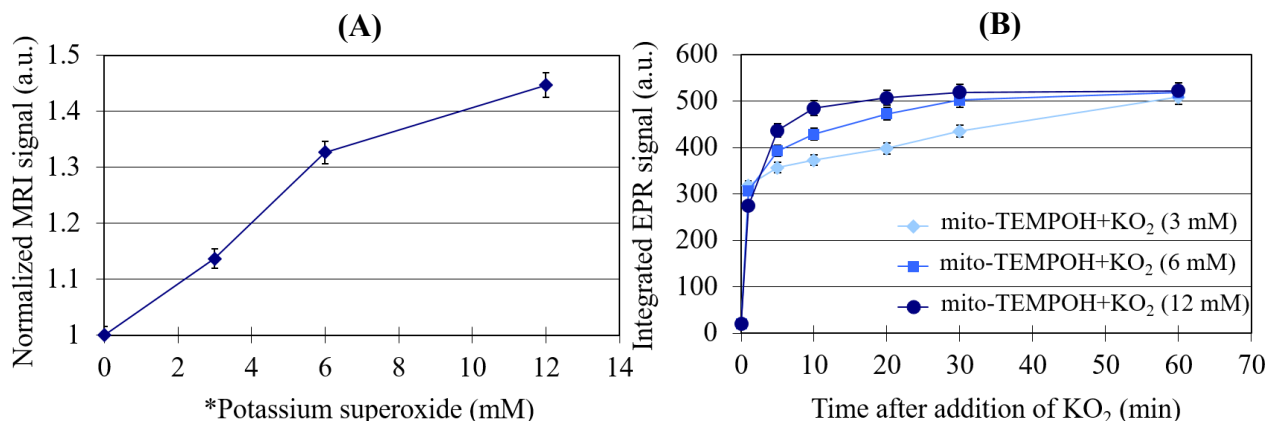
Установено е, че, при концентрации на водни разтвори на водороден пероксид под 0.1 М, в спектъра на ЯМР се наблюдават два остри протонни резонанса, съответно при 4.7 и 11.1 ppm (Stephenson et al, 2005). Първата от тези линии се дължи на протоните във водата, а втората се дължи на протоните във водородния пероксид. При нарастване на концентрациите на пероксида, линиите на водородния пероксид и водата се сближават, а впоследствие се сливат до образуване на единичен пик, който е силно уширен. Според Stephenson и съавтори, това явление се дължи на обмена на протони между водата и водородния пероксид. С увеличаването на концентрацията на водороден пероксид, скоростта на обмен на протони става значителна и в резултат се наблюдава този разширен пик. Местоположението на максимума на тази широка линия намалява линейно с увеличаване на концентрацията на водороден пероксид (Stephenson et al, 2005).

Имайки предвид казаното по-горе, намаляването на MRI сигнала в моделни системи, включващи водни разтвори на водороден пероксид с различна концентрация (Фигура 2А и В), може да се обясни за по-високите концентрации именно с промяната на химичното отместване, вследствие протонния трансфер, при което намалява концентрацията на протони, намиращи се в условия на резонанс.

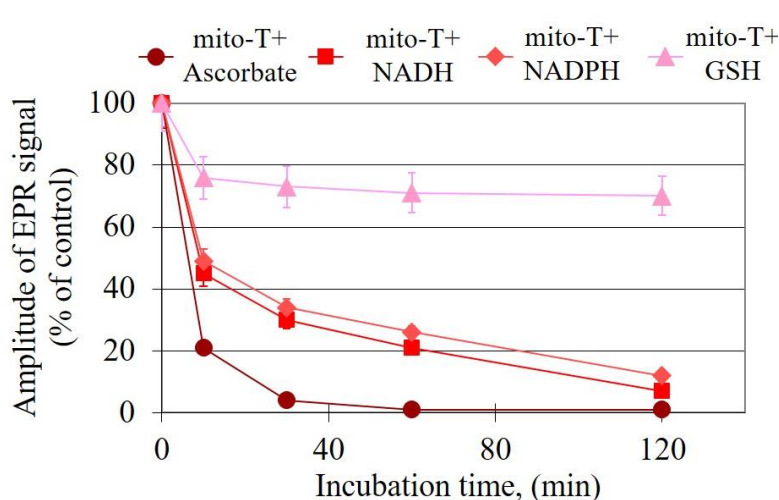
На третият панел (С) от Фигура 2 е представена динамиката на EPR сигнала в моделна система mito-TEMPO/H₂O₂ (с концентрации на пероксида 0.1 и 1.5 М). От резултатите се вижда, че водородният пероксид не повлиява EPR контраста на нитроксидната сонда за времето на скениране от 60 минути, което потвърждава тезата, че водородният пероксид повлиява единствено протоните, участващи в ядрения магнитен резонанс, но не взаимодейства с нитроксидния радикал.

Фигура 3 представя резултати за промени в T₁ времето на релаксация и динамика на EPR сигнала в моделна система mito-TEMPOH/KO₂. mito-TEMPOH е диамагнитната неконтрастна форма на mito-TEMPO. При добавяне на калиев супероксид към mito-TEMPOH се наблюдава увеличаване на MRI сигнала, с увеличаване на концентрациите на супероксида. Проследена е и динамиката на EPR сигнала за три различни изходни концентрации на супероксид (3, 6 и 12 mM), като за времето на скениране и при трите проби от липса на сигнал се достига едно и също максимално ниво на EPR сигнал. Нарастването на MRI/EPR сигнала показва, че с увеличаване на концентрацията на калиев

супероксид и времето на инкубиране, генерираните в системата супероксидни радикали окисляват неконтрастната хидроксиламинна форма на сондата и я превръщат в радикал (контрастния mito-TEMPO).



Фигура 3. (А) Ефект на калиевия супероксид върху T_1 времето на релаксация от mito-TEMPOH в дейонизирана вода (gradient-echo MRI). MRI данните са получени на фантоми, съдържащи една и съща концентрация mito-TEMPOH (редуцирана форма на mito-TEMPO) (1 mM) и различни концентрации на калиев супероксид. Забележка: *Времето между разтварянето на калиевия супероксид в дейонизирана вода и началото на MRI измерванията е ~ 10 min. Затова, реалната концентрация на калиевия супероксид в системата води до образуване и наличие на много по-ниски концентрации на супероксид (в μM) при стартиране на MRI измерването. Причината за това е предположението, че калиевият супероксид се разлага веднага и напълно до супероксиден радикал, който от своя страна се превръща във водороден пероксид със скоростна константа на реакцията $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kishioka et. al., 2004). Данните са обработени със софтуер *ParaVision*. (В) Динамика на интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPOH (1 mM) в присъствие на калиев супероксид в различни концентрации. Всички данни са измерени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.



Фигура 4. Динамика на интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO (1 mM) в присъствие на различни редуктори (1:1, mol:mol): 1 mM Ascorbate; 1 mM NADH; 1 mM NADPH; 1 mM GSH (разтворени в дейонизирана вода с $25 \mu\text{M}$ DTPA). Данните са представени като процент от началната амплитуда на EPR сигнала на

mito-TEMPO в отсъствие на редуктор (считана за 100%). Всички данни са измерени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

На Фигура 4 са представени експериментални данни на динамиката на EPR сигнала на mito-TEMPO в присъствие на различни редуктори – аскорбат, NADH, NADPH и глутатион. За времето на инкубиране се регистрира намаляване на сигнала в различна степен от различните изследвани редуктори. Намаляването на сигнала се дължи на редукцията на нитроксидния радикал и превръщането му в неконтрастния хидроксиламин. Най-силна редукция на нитроксидния радикал се наблюдава от аскорбат, като за около 40 минути EPR сигналът почти напълно изчезва. Известно е, че хидроксиламинът е единственият продукт на редукцията на нитроксидния радикал от аскорбат (основен редуктор в клетката) (Bobko et al, 2007). Значително намаляване на сигнала се наблюдава и при моделните системи нитроксид/NADH и нитроксид/NADPH, като за времето на инкубиране се достига до нива на EPR сигнала под 20 % от сигнала на mito-TEMPO. При системата нитроксид/глутатион се наблюдава запазване на EPR сигнала на около 80 % от началните нива, за времето на скениране от 120 минути, т. к. глутатионът не може директно да редуцира нитроксидните радикали. В биологични системи глутатионът повлиява редукцията на нитроксида, като вторичен източник на редуциращи еквиваленти (Bobko et al, 2007). Това обяснява по-слабата редукция на нитроксида в моделна система нитроксид/глутатион.

С различни техники за визуализиране, като флуоресцентен имиджинг и PET, използващи редокс-чувствителни контрастни субстанции, е установено, че супероксидът и водородният пероксид играят роля в процесите на сигнална трансдукция в клетките, както и са отговорни за развитието на различни патологии (Trachootham et al., 2009; Fulda et al., 2010; Lin et al., 2013; Dickinson et al., 2013; Hu et al., 2012; Zhang et al., 2012). Възможността за регистриране на супероксид и водороден пероксид (както и тяхното съотношение) в биологични системи *in vivo* би дало възможност за изясняване на фините молекулярни механизми, отговорни за патогенезата на редица сериозни заболявания като невродегенеративни заболявания, канцерогенеза и др. Флуоресцентният редокс-имиджинг, обаче, е все още на стадий *in vitro*, поради трудностите за дълбокотъканно изобразяване в резултат на взаимодействието на светлината с тъканите и липсата на подходящи редокс-чувствителни флуоресцентни сонди в близката инфрачервена област на спектъра. PET предлага възможности за редокс-имиджинг *in vivo*, но с ниска резолюция. Съществуващите понастоящем редокс-чувствителни PET трейсъри дават възможност за косвено изобразяване на тъканния редокс-статус, на базата на визуализиране на биохимични процеси, за които се знае, че се съпътстват с генериране на ROS или

промени в редуциращите еквиваленти (Okamura et al, 2015). Тези PET трейсъри, обаче не позволяват пряка детекция на ендогенните нива на супероксид и водороден пероксид в клетките и тъканите. В този контекст, нитроксид-усилените магнитно-резонансни техники предлагат значително по-големи възможности за редокс-имиджинг *in vivo* – с висока резолюция и пряка детекция на свръх-продукция на супероксид в живи клетки и тъкани.

II. Прилагане на нитроксид-усилен EPR за визуализиране и оценка на клетъчния редокс-статус на изолирани клетъчни линии (с различен пролиферативен индекс и степен на диференциация) *in vitro*.

Общоприето е схващането, че нормалните (неракови) клетки се характеризират с ниски нива на ROS и постоянни (референтни) нива на редуциращи еквиваленти, а раковите клетки се характеризират с редокс-дисбаланс в полза на окислителните еквиваленти (ROS) (Trachootham et al., 2009, Zhelev et al., 2010, Bakalova et al., 2013). Нивата на редуциращите еквиваленти също са повишени в раковите клетки. Тъй като активните форми на кислорода са преки участници в процесите на сигнална трансдукция в клетката, при повишаването на тяхната концентрация над определени нива, те могат да индуцират нестабилност на генома и неконтролируема пролиферация.

В биологични системи, времето на живот на ROS е много кратко – варира от наносекунди до няколко секунди, в зависимост от тяхната реактивност и нивото и активността на клетъчните антиоксидантни системи (Dikalov et al, 2014). По тази причина, детекцията на активните форми на кислорода в биологични системи е трудна задача и изисква използването на подходящи контрастни субстанции. Необходимо е подбраните контрасти да „конкурират“ вътреклетъчните антиоксиданти и да формират стабилни продукти с ROS, което да позволи тяхната детекция.

През последните години все повече се работи в посока на откриване на редокс-чувствителни контрастни субстанции и разработване на подходящи методики за детекция на ROS. Има няколко основни метода, които дават възможност за анализ на ROS с помощта на контрастни субстанции – флуоресценция, хемилуминесценция, магнитен резонанс – EPR и MRI, нуклеарни техники – PET, СПЕКТ. EPR има редица предимства пред останалите методи за откриване на ROS *in vitro* (Dikalov et al, 2014). На първо място, причина за това е същността на метода – изцяло основан на физичен принцип, което изключва условности и предположения. На второ място, с EPR не само могат да бъдат детектирани свободните радикали, но и да бъдат идентифицирани по вид.

Ето защо, EPR спектроскопията е приета за един от най-високо чувствителните и бързи методи – „златен стандарт“, при изследването на свободни радикали (Mason, 2016).

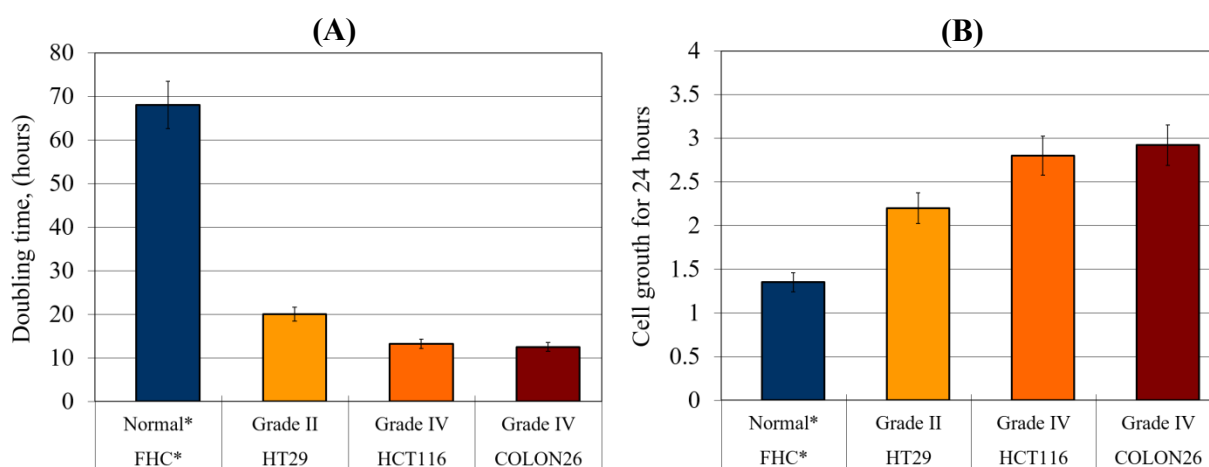
Има данни от *in vitro* проучвания за динамиката на EPR сигнала при нормални и левкемични лимфоцити, с използване на три нитроксидни радикала, с различна степен на хидрофобност и локализация в клетката (mito-TEMPO – проникващ през клетъчната мембрана и локализиращ се предимно в митохондриите; methoxy-TEMPO – проникващ през клетъчната мембрана и разпределящ се произволно между цитоплазмата и вътреклетъчните органели; CPx – непроникващ в живи клетки и равномерно разпределен в извънклетъчната среда (Желев, 2017). Получените от автора резултати показват незначително намаляване на EPR сигнала при клетъчни суспензии от левкемични лимфоцити и рязко понижаване при суспензии от нормални лимфоцити, с използване на двете хидрофобни (проникващи в клетката) сонди (mito-TEMPO и methoxy-TEMPO). Този резултат се обяснява с високия оксидативен капацитет на левкемичните лимфоцити и запазване радикаловата форма на нитроксида и, респективно, висок редуциращ капацитет на нормалните лимфоцити и превръщане на нитроксидния радикал в диамагнитен хидроксиламин. При използване на CPx, кинетичните криви имат сходен профил, независимо от вида на клетките, което авторът обяснява с факта, че сондата не прониква през клетъчната мембрана и следователно, не може да бъде повлияна от вътреклетъчните редуктори и окислителни агенти.

В този раздел на дисертацията са направени *in vitro* експерименти с помощта на EPR спектроскопия на изолирани клетъчни линии (с еднакъв произход и различен пролиферативен индекс и степен на диференциация) с използване на mito-TEMPO. Спин-сондата прониква през клетъчната мембрана и се локализира предимно в митохондриите – един от главните източници на ROS в организма.

За изясняване ролята на супероксида и водородния пероксид за клетъчната пролиферация и степен на злокачественост, в настоящите експерименти е направено сравнение на редокс-статуса на нормални и ракови клетки с еднакъв произход, но различни по ниво на диференциация: FHC, HT29, HCT116 и Colon26. Всички клетъчни линии са от епител на лигавица на дебелото черво: FHC – нормални епителни клетки от дебело черво, HT29 – клетъчна линия от пациенти с колоректален аденокарцином, II ниво на диференциация, HCT116 и Colon26 – клетъчни линии от пациенти с колоректален карцином, IV ниво на диференциация. Супероксидът и водородният пероксид са основни окислителни агенти в клетката и участници в клетъчната сигнализация. Предполага се, че те активират различни сигнални пътища, поради което е

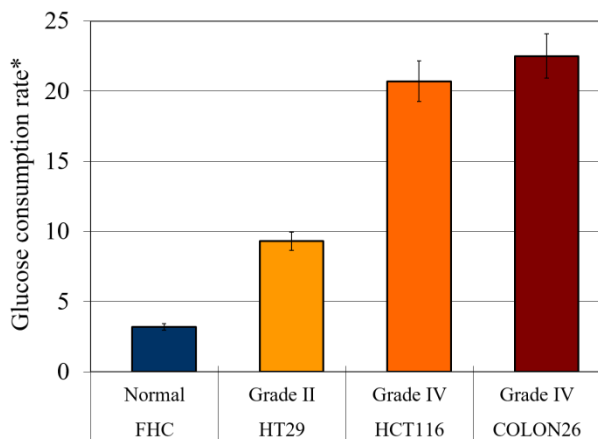
важна не само тяхната детекция изобщо, но и възможността за определяне на концентрациите им в абсолютни единици и респективно, на съотношението им (Aykin-Burns et al., 2009; Zhelev et al., 2019).

На Фигура 5А са представени данни за времето на удвояване на изследваните клетъчни линии, а на Фигура 5В – клетъчният растеж за едно денонощие. От графиките се вижда, че времето на удвояване на клетките нараства в следния ред: FHC > HT29 > HCT116 > Colon26, а растежът на колониите има точно обратен ход: FHC < HT29 < HCT116 < Colon26. Както може да се очаква, нормалните (неракови) клетки имат най-голямо време на удвояване на броя си, а HCT116 и Colon26 линиите, които се характеризират с най-високо ниво на злокачественост и инвазивност от използваните линии, се удвояват най-бързо.



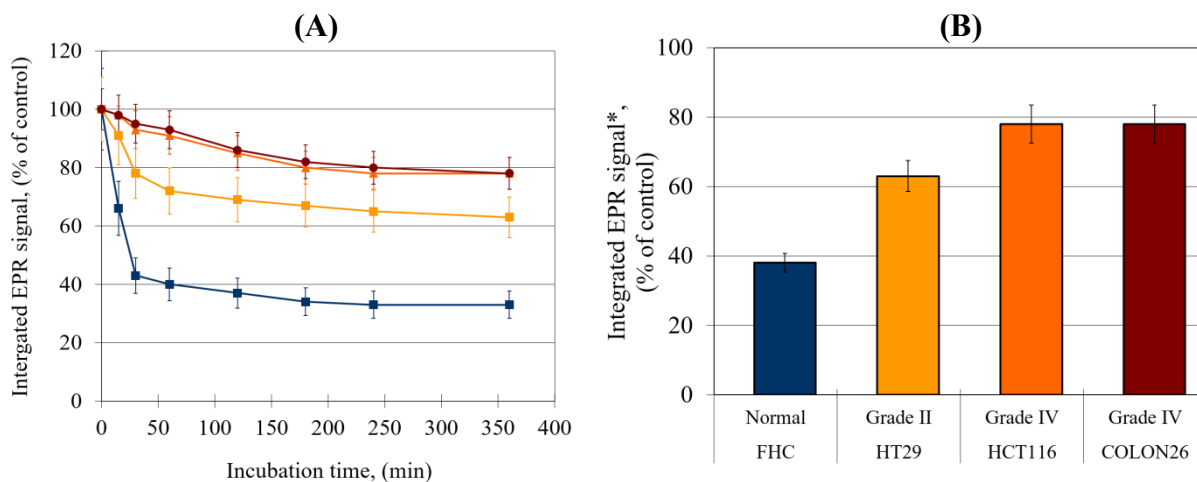
Фигура 5. (А) Време за удвояване на броя клетки и клетъчен растеж за 24 h на нормални (FHC) и ракови клетки от епител на дебело черво (HT29, HCT116, Colon26). Началният брой клетки е 1×10^4 клетки на ямка за всички клетъчни линии. *FHC клетките са култивирани в среда на DMEM-F12, с добавени EGF, холерен токсин, инсулин, трансферин, хидрокортизон и термално инактивиран FBS. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента. **(В)** Клетъчен растеж за 24 часа на четирите линии FHC, HT29, HCT116 и Colon26.

Фигура 6 дава информация за глюкозната консумация на изследваните видове клетки, която е в реда FHC < HT29 < HCT116 < Colon26. От резултатите се вижда, че нормалните клетки FHC имат най-малка консумация на глюкоза, за разлика от най-агресивните ракови клетки Colon26. Изследването за консумация на глюкоза от клетките е информативно, т. к. раковите клетки се характеризират с промени в метаболизма, особено по отношение на употребата на глюкоза. Малигнените клетки проявяват аномалии в процесите на гликолиза и цикъла на Кребс и консумират 5-10 пъти повече глюкоза в сравнение с нормалните клетки (Hamanaka & Chandel, 2012; Fadaka et al, 2017).



Фигура 6. Глюкозна консумация на нормални (FHC) и ракови клетки от епител на дебело черво (HT29, HCT116, Colon26). Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента. * $\mu\text{mol}/10^6$ клетки/24 часа.

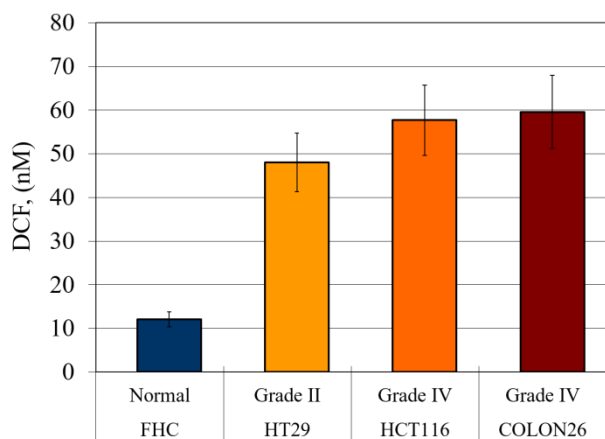
На следващата Фигура 7 са представени данни за интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO в клетъчните суспензии. От резултатите се вижда, че интензитетът на нитроксид-усиления EPR сигнал корелира с нивото на клетъчен растеж (пролиферативния индекс), респективно със степента на редукция на нитроксидния радикал. При нормалните клетки се наблюдава най-висока степен на редукция на mito-TEMPO и в резултат – най-силно намаляване на EPR интензитета. Това се дължи на превръщането на контрастния радикал в неговата неконтрастна радикалова форма – хидроксиламин (Zhelev et al., 2013). За разлика от нормалните клетки, за раковите клетки дори и след 6 часа инкубиране, се наблюдава много висок интензитет на нитроксид-усиления EPR сигнал. Резултатите говорят за повишена окислителна способност на раковите клетки, която изцяло следва хода на данните за техния растеж и глюкозна консумация. Наличието на EPR сигнал означава, че използваната нитроксидна сонда е в своята контрастна радикалова форма, което е резултат от по-високият оксидативен капацитет и високите нива на супероксид в раковите клетки. Промени в профила на EPR спектрите не бяха наблюдавани.



Фигура 7. (А) Динамика на нитроксид-усилен EPR сигнал с mito-TEMPO (0.1 mM) на нормални (FHC) и ракови клетки от епител на дебело черво с различна степен на

пролиферация и диференциация (HT29, HCT116, Colon26) (3×10^6 cells/mL) за 6 часа инкубация. Контрола: mito-TEMPO (0.1 mM) в клетъчна среда. Mito-TEMPO не повлиява клетъчната преживяемост при избраните експериментални условия. (В) Нитроксид-усилен EPR сигнал с mito-TEMPO на HTC, HT29, HCT116, Colon26 линии след 6 часа инкубация. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

Гореописаните данни за нивата на окислителните еквиваленти при раковите клетки и тяхната корелация с нитроксид-усиления EPR сигнал е верифицирана и с конвенционални аналитични тестове: (1) DCF-тест за анализ на хидропероксиди; (2) DHE-тест за анализ на цитозолен супероксид; (3) mitoSOX-тест за анализ на митохондриален супероксид; (4) Анализ на общия антиоксидантен (редуциращ) капацитет на биологични проби.



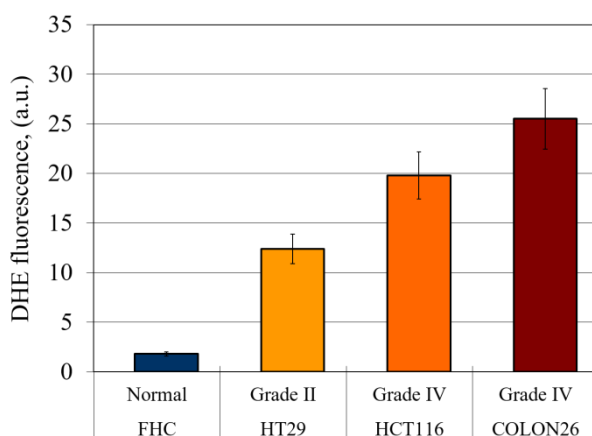
Фигура 8. Концентрации на вътреклетъчните хидропероксиди на нормални (FHC) и ракови (HT29, HCT116, Colon26) клетки, определени с конвенционален DCF-тест. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

На Фигура 8 са представени резултати за нивата на вътреклетъчните хидропероксиди. Нивата на хидропероксидите нарастват с увеличаване нивото на диференциация и инвазивност на туморните клетки, а именно, нормалните клетки имат най-ниски нива на хидропероксиди, а най-агресивните туморни клетки са с най-високо съдържание на H_2O_2 . Наблюдава се много добра положителна корелация между измерените нива на H_2O_2 и интензитета на EPR сигнала на mito-TEMPO в изследваните клетъчни линии, което би могло да се дължи на факта, че изследваните клетъчни линии са с еднакъв произход (Фигура 12). Други автори, съобщават за слаба корелация между интензитета на нитроксид-усиления EPR сигнал и нивото на хидропероксиди, анализирано чрез DCF-тест на клетки с различен пролиферативен индекс и различен произход (неракови линии – нормални лимфоцити, ендотелни клетки и кератиноцити и ракови – левкемични, от колоректален карцином, глиома и невробластома) (Желев, 2017). Доколкото водородният пероксид не повлиява сам по себе си интензитета на EPR сигнала на спин-сондата

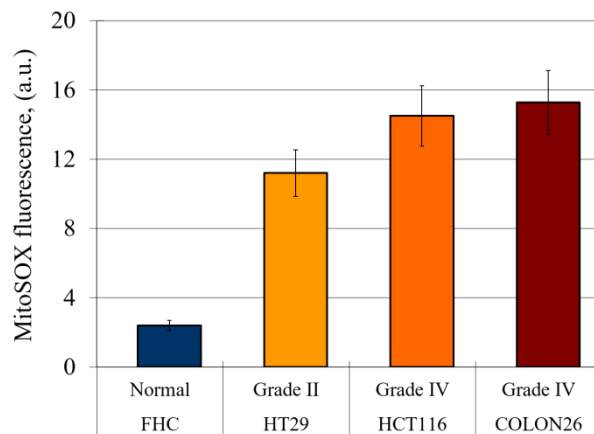
(Фигура 2), то разликите между клетките биха могли да се отдадат на други фактори, напр. различно ниво на супероксидни радикали в зависимост от степента на диференциация.

Следващите две Фигури 9 и 10 представят данни от конвенционални тестове за анализ на супероксид – DHE-тест за анализ на цитозолен супероксид и DHE-тест с използване на модифициран аналог на DHE, наречен mitoSOX с включена трифенилфосфониева група, която позволява натрупването му в митохондриите (Robinson et al, 2008). Резултатите и от двата теста показват нарастване на нивата на супероксид с увеличаване на клетъчния растеж в рамките на 24 часа, и тези данни много добре корелират с резултатите от EPR анализа (Фигура 12). Много добра положителна корелация се наблюдава между нивото на митохондриалния супероксид и данните от EPR анализа ($R=0.9950$, $p<0.01$). Тези данни са в съответствие с получените от Dikalov et al. (2011), според които mitoSOX позволява откриване на митохондриално генериран супероксид и респективно, разграничаването му от цитоплазмения такъв.

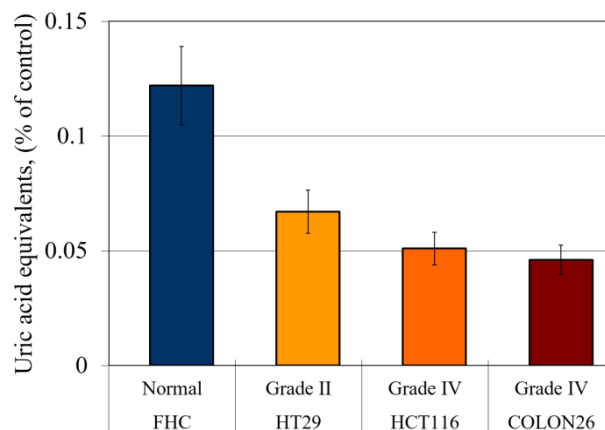
С намаляване на супероксида, намаляват и интензитетите на нитроксид-усилените EPR спектри, което показва, че съотношението на редуциращи към окислителни еквиваленти е в полза на редуциращите и респективно се увеличава редуциращият капацитет на клетките (характерно за нормалните клетки и тъкани). Тук е редно да се отбележи, че DHE-тестът не може да се използва за получаване на информация за супероксида в абсолютни единици (моларни концентрации) (Zielonka et al, 2008).



Фигура 9. Нива на вътреклетъчния цитозолен супероксид на нормални (FHC) и ракови (HT29, HCT116, Colon26) клетки, определени с конвенционален DHE-тест. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

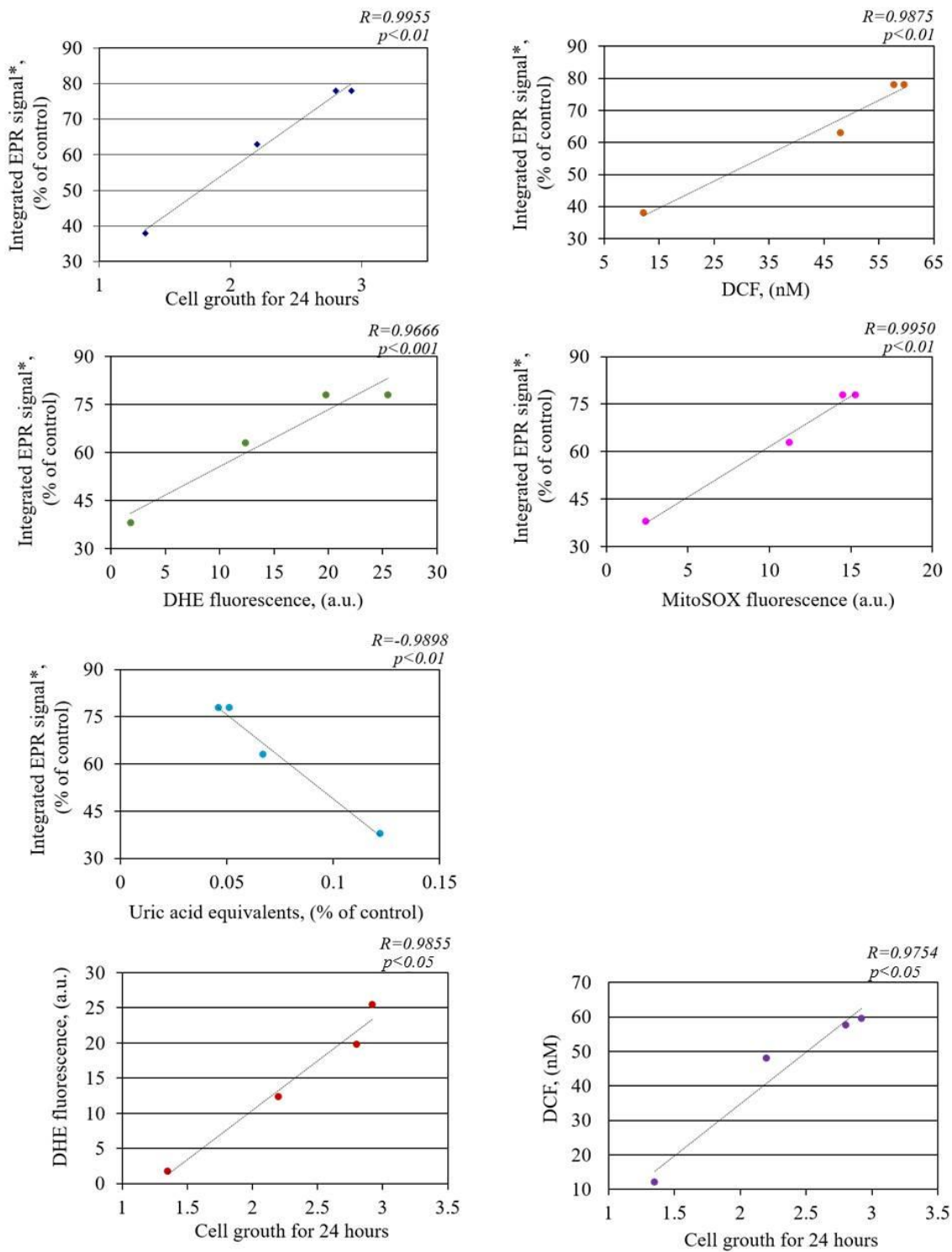


Фигура 10. Нива на вътреклетъчния митохондриален супероксид на нормални (FHC) и ракови (HT29, HCT116, Colon26) клетки, определени с конвенционален DHE-тест. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.



Фигура 11. Нива на вътреклетъчните антиоксиданти и редуциращи еквиваленти на нормални (FHC) и ракови (HT29, HCT116, Colon26) клетки, определени с *OxiSelectTM Total Antioxidant Capacity Assay*. Всички данни са представени като средна стойност \pm SD от три независими експеримента.

Последният конвенционален тест за верифициране на данните, получени от EPR спектроскопията и нивото на пролиферация на клетките е анализът на общия антиоксидантен (редуциращ) капацитет. Данните са представени на Фигура 11. Генерираните ROS в клетките и тъканите се неутрализират от антиоксидантите и другите ендогенни вътреклетъчни редуктори. Резултатите на фигурата показват висока редуцираща способност на нормалните клетки и намаляване на редуциращия капацитет при раковите клетки, в зависимост от тяхната злокачественост.



Фигура 12. Корелация между степента на пролиферация, клетъчния редокс-статус (анализиран чрез EPR спектроскопия), цитозолния супероксид (анализиран чрез DHE-тест), митохондриалния супероксид (анализиран чрез mitoSox-тест) и вътреклетъчните хидропероксиди (анализирани чрез DCF-тест). R – коефициент на корелация.

За данните, описани в раздела, са направени корелационни анализи, представени на Фигура 12. Установени са следните корелационни

зависимости между интензитета на нитроксид-усиления EPR сигнал и изследваните параметри:

- (1) много добра положителна корелация между интензитета на EPR сигнала и клетъчния растеж на различните линии ($R=0.9955$, $p<0.01$);
- (2) много добра положителна корелация между интензитета на EPR сигнала и базалните нива на хидропероксидите, анализирани с DCF-тест ($R=0.9875$, $p<0.01$);
- (3) много добра положителна корелация между EPR сигнала и базалните нива на супероксид, анализирани с DHE-тест ($R=0.9666$, $p<0.01$);
- (4) много добра положителна корелация между EPR сигнала и базалните нива на митохондриален супероксид, анализирани с mitoSOX ($R=0.9950$, $p<0.01$);
- (5) много добра отрицателна корелация между интензитета на EPR сигнала и общия редуциращ капацитет ($R=-0.9898$, $p<0.01$).

Получените данни са в съответствие с други експериментални и клинични изследвания. Aykin-Burns et al. съобщават, че ракови клетки от епител на дебело черво (HT29, HCT116, SW480) се характеризират със значително увеличение на флуоресцентния сигнал от DHE- и DCF-тестовите, в сравнение с нормалните клетки. Също така, нивата на супероксид и водороден пероксид показват висока степен на корелация с нивото на диференциация на клетките, което се наблюдава и при нормални епителни клетки от млечна жлеза (HMEC) и ракови от същия произход (MB231) (Aykin-Burns et al, 2009).

Skrzydowska et al. съобщават за значително увеличение нивото на продукти от липидна пероксидация и намаляване на антиоксидантния капацитет при клетки от хистологични препарати от първични колоректални карциноми, в сравнение с нормални такива, взети от макроскопски непроменени и максимално отдалечени от тумора, участъци на дебелото черво. Промените в нивата на продуктите от липидна пероксидация и антиоксидантния капацитет следват нивата на диференциация на раковите клетки – най-високо ниво на продуктите на липидна пероксидация и най-ниско ниво на антиоксидантите са характерни за IV ниво на диференциация (Skrzydowska et al, 2005).

Трябва да се подчертае, че конвенционалните флуорофори (DHE, mitoSOX, DCF) не могат да дадат оценка на съотношението супероксид/водороден пероксид в клетъчните суспензии, т. к. нивата на супероксида не могат да бъдат измерени в абсолютни единици (Kalyanaraman et al, 2012). Не е възможно да се изчислят моларните концентрации на супероксида с използване на сонди като DHE и mitoSOX и респективно, да се сравнят данните за водородния пероксид (получени в

mol/l). Използването на нитроксидите като сензор за редокс-статуса, би могло да даде възможност за точна оценка на моларните концентрации на супероксида, т. к. нитроксидите реагират със супероксида в реакция от първи порядък (една единствена). Това свежда до минимум възможностите за получаване на неточна информация и неправилно интерпретиране на резултатите, както би се получило при многоетапни редокс-реакции. Следователно, може да се предположи, че нитроксид-усилената EPR спектроскопия с използване на mito-TEMPO (или друг цикличен нитроксид), след прецизиране и унифициране на методологията, може да се прилага за изчисляване на стационарни вътреклетъчни концентрации (в абсолютни единици) на супероксид. За потвърждаване на изложеното предположение са необходими още бъдещи експерименти. Описаната от нас EPR методика е приложима на изолирани клетки, тъканни препарати (включително биопсични) и телесни течности. В заключение, EPR спектроскопията с използване на нитроксидни сонди, проникващи в клетката, заедно с конвенционалните аналитични тестове, може да позволи точно изчисляване на съотношението супероксид/водороден пероксид и, следователно, точна оценка на редокс-баланса.

III. Изследване на възможността за визуализиране на тъканния редокс-статус на бъбреците при мишки с експериментален модел на хиперхолестеролемия, чрез използване на MRI и mito-TEMPO като контрастна субстанция

Най-често използваните техники за визуализиране на бъбречна функция са контраст-усилен MRI, компютърна томография и ултразвуково изследване (El-Baz et al, 2006; Dong et al, 2014). Приложението на контрастни вещества крие риск от интоксикация при пациенти с нарушена бъбречна филтрация, поради задържането им в организма. По тази причина усилията на клиницисти и изследователи са насочени основно в две направления: (1) разработване на неконтрастни методи за визуализация и оценка на бъбречната дисфункция и (2) разработване на нетоксични или много ниско токсични контрастни вещества за функционална урография (Bashir et al, 2013; Milman et al, 2014).

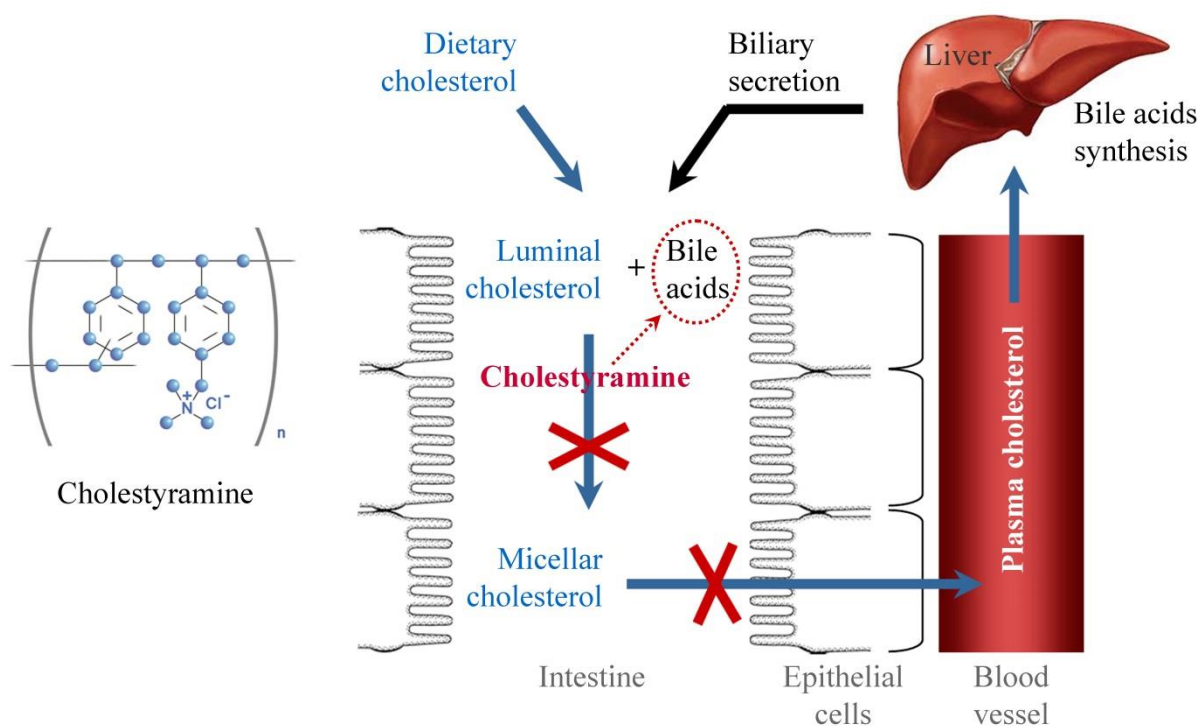
Бъбречната дисфункция се индуцира главно от възпалителни и/или атерогенни фактори, като тя е съпроводена с редокс-дисбаланс, респективно намален редуциращ капацитет и развитие на оксидативен стрес (Betjes, 2013). Продължителното действие на тези фактори води до необратими структурни увреждания на бъбреците и развитие на бъбречна недостатъчност – патология, при която животът на пациента се поддържа

чрез хемодиализа, докато се намери подходящ донор за бъбречна трансплантация.

Редокс-статусът на клетките, тъканите и телесните течности силно се повлиява от възпалителни и атерогенни фактори. Следователно, редокс-статусът на бъбречните тъкани би могъл да се използва и като биомаркер за ранното увреждане на бъбреците.

В настоящото изследване е използван mito-TEMPO за неинвазивно визуализиране на бъбречна дисфункция при мишки. Бъбречната дисфункция е предизвикана от хиперхолестеролемия и последващо развитие на гломерулосклероза.

Експериментите са осъществени върху три групи мишки: група 1 – отглеждани на нормална диета (ND мишки), група 2 – на холестеролна диета (CD мишки), група 3 – на холестеролна диета плюс антилипидемичния препарат холестирамин (СС мишки). Показано е, че богатата на холестерол диета индуцира високи холестеролни нива – хиперхолестеролемия (Tomizawa et al. 2011a), а препаратът холестирамин намалява холестерола в плазмата и респективно предпазва от хиперхолестеролемия (Hermankova et al. 2018).



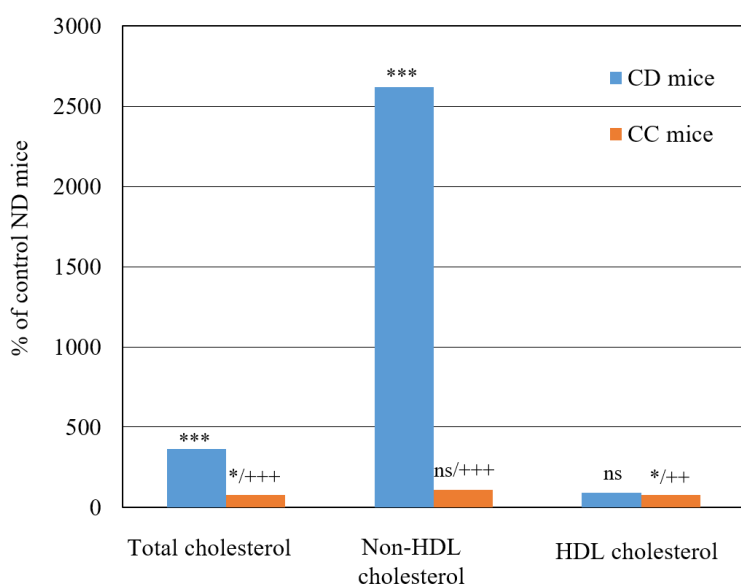
Фигура 13. Структурна формула на холестирамин и механизъм на действие.

Холестираминът е йонно-обменен полимер, който свързва жлъчните киселини в неразтворими комплекси (Фигура 13). Жлъчните киселини се синтезират от холестерол в черния дроб и се отделят в горната част на стомашно-чревния тракт. При свързване на холестирамина с жлъчните киселини в стомашно-чревния тракт се предотвратява тяхната реабсорбция в тънкото черво, като по този начин се увеличава

екскрецията им от организма. Ниските нива на жлъчни киселини в порталната вена и черния дроб индуцират синтеза „*de novo*” на жлъчни киселини, което е съпроводено с повишено извличане на холестерол от кръвната плазма. В резултат, плазменият холестерол намалява (Фигура 13).

След 15 седмици от започването на съответната диета, мишките са подложени на следните анализи: (1) нива на плазмен холестерол; (2) функционални тестове на бъбреците, включващи тотален белтък, албумин, уреа, серумен креатинин, пикочна киселина; (3) нитроксид-усилен MRI с mito-TEMPO като редокс-сензор за определяне промяната в редокс-статуса на бъбреците *in vivo*; (4) микроскопия на хистологични препарати от бъбреци; (5) определяне на антиоксидантен капацитет и нива на ROS в тъканни хомогенати, с използване на конвенционални тестове *in vitro*.

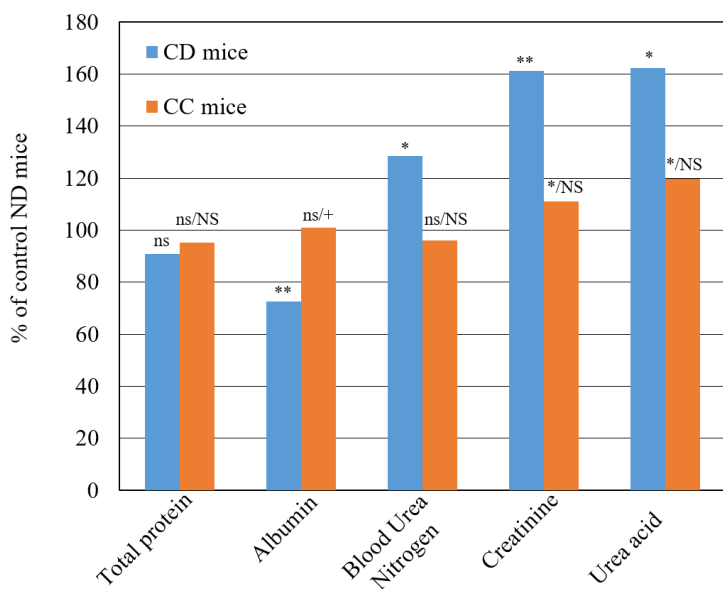
Мишките на холестролна диета се характеризират със значително повишени нива на тотален холестерол и non-HDL-холестерол в кръвната плазма, и понижени нива на холестерола в HDL фракцията, в сравнение с мишките на нормална диета (Фигура 14). Представените данни потвърждават развитието на хиперхолестеролемия при групата на холестеролна диета. Мишките на холестеролна диета, приемащи и холестирамин, се характеризират със слабо повишени нива на тотален холестерол, непроменени нива на non-HDL-холестерол и понижени нива HDL-холестерол в кръвната плазма, в сравнение с мишките на нормална диета (Фигура 14). Данните доказват, че холестираминът ефективно намалява нивата на холестерола.



Фигура 14. Нива на тотален холестерол, non-HDL-холестерол и HDL-холестерол в кръвна плазма като % от контролата (ND), на мишки на холестеролна диета – CD, и на холестеролна диета плюс холестирамин – CC. Всички анализи са направени 15 седмици след започване на диетата, съответно без или с лекарство. Всички данни са представени като средна стойност±SD. Означенията над

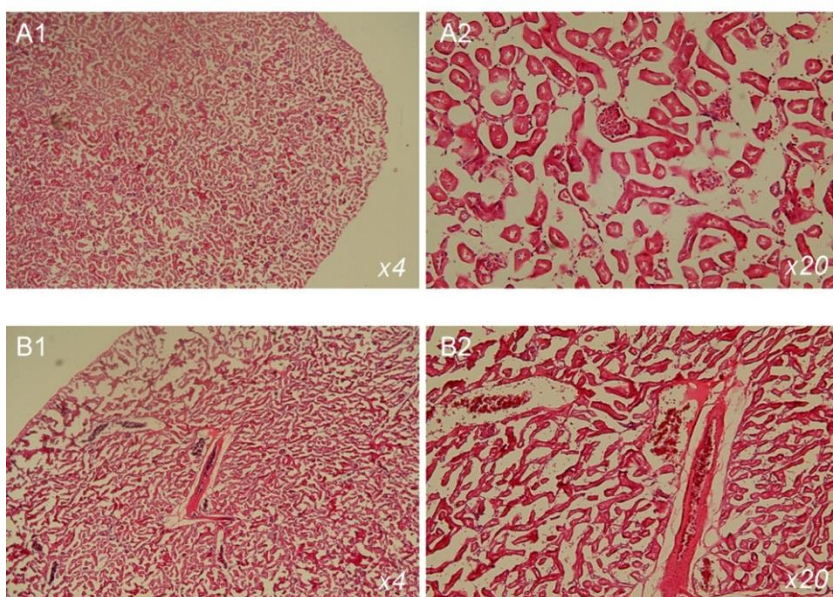
колонките показват статистическа достоверност както следва: ns – няма статистическа достоверност спрямо група ND; ***P<0.001, *P<0.05 спрямо група ND; +++P<0.001, ++P<0.01 спрямо група CD. Броят на мишките във всяка група е 5.

Хиперхолестеролемията при мишките на холестеролна диета е съпроводена с патологични промени във функцията на бъбреците. Нивата на уреа, серумен креатинин и пикочна киселина се увеличават значително (Фигура 15). При мишките, приемащи и холестирамин, гореспоменатите параметри от функционалните тестове са почти без промяна, сравнени със здравите животни.



Фигура 15. Сравнение на нива на тотален белтък, албумин, уреа, серумен креатинин, пикочна киселина като % от контролата (ND), на мишки на холестеролна диета – CD, и на холестеролна диета плюс холестирамин – CC. Всички анализи са направени 15 седмици след започване на диетата, съответно без или с лекарство. Всички данни са представени като средна стойност±SD. Означенията над

колонките показват статистическа достоверност както следва: ns – няма статистическа достоверност спрямо група ND; **P<0.01, *P<0.05 спрямо група ND; +P<0.05 спрямо група CD; NS – няма статистическа достоверност спрямо група CD. Броят на мишките във всяка група е 5.



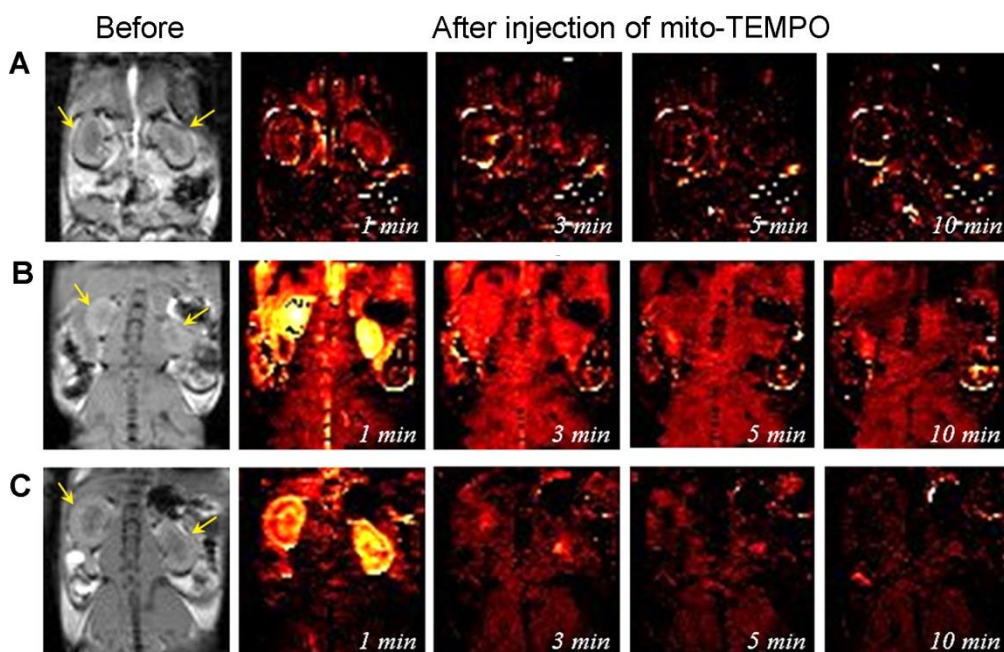
Фигура 16. Хематоксилин-еозин оцветяване на тъканни срези от бъбреци, изолирани от мишки на нормална диета (А) и холестеролна диета (В). Животните са на възраст 20 седмици.

При анализ на хистологичните препарати в края на изследването се виждат гломерулни лезии (Фигура 16). Подобни резултати с развитие на

бъбречна дисфункция, съпътстваща хиперхолестеролемията, се съобщават и от други автори (Bentley et al. 2002; Qiao et al. 2009; Fang et al. 2016).

Изображения на бъбреци от нитроксид-усилен MRI са представени на Фигура 17. Нитроксид-усиленият MRI сигнал е екстрахиран от всяко изображение след инжектиране на mito-TEMPO и е нормиран към базовата линия (преди инжектиране).

При групата на здравите мишки се регистрира слабо повишаване на MRI сигнала, непосредствено след инжектиране на mito-TEMPO, който изчезва напълно в рамките на 3 минути (Фигура 17А). Резултатът е доказателство за превръщането на нитроксидния радикал в неговата диамагнитна хидроксиламинна форма, което може да се обясни с високата редуцираща способност на здравите бъбречни тъкани, поради наличието на големи количества аскорбат в тях (Фигура 17А) (Iannone et al, 1990).

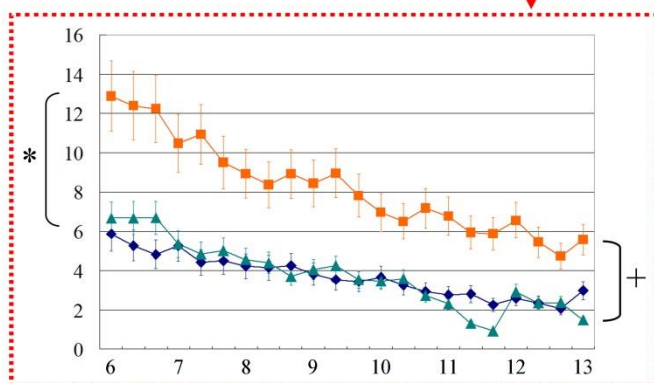
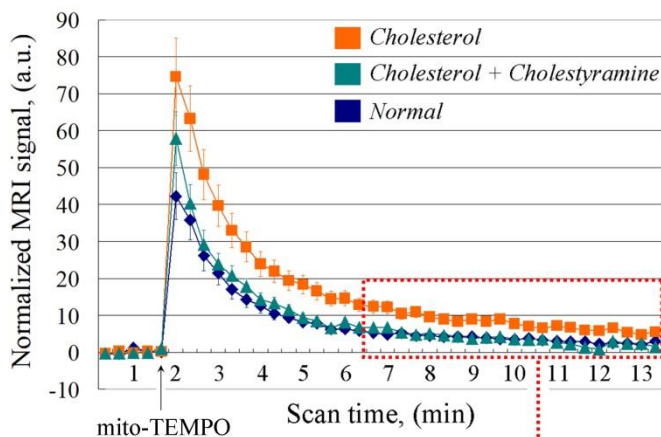
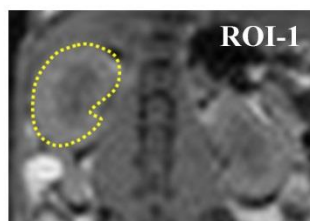


Фигура 17. Нитроксид-усилен MRI сигнал на бъбреци на мишки на нормална диета (А), холестеролна диета (В), холестеролна диета плюс холестирамин (С), след инжектиране на mito-TEMPO. Черно-бели изображения: Анатомични MRI изображения на бъбреци, преди инжектиране на mito-TEMPO. Цветни изображения: Екстрахиран нитроксид-усилен MRI сигнал, регистриран на 1-та, 3-та, 5-та и 10-та минути след инжектиране на mito-TEMPO.

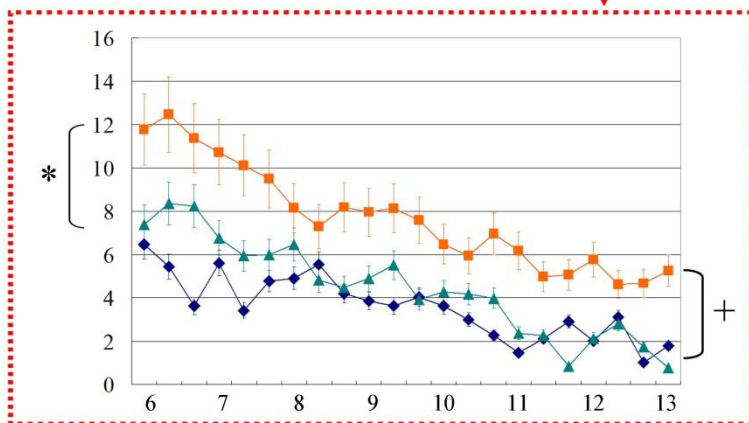
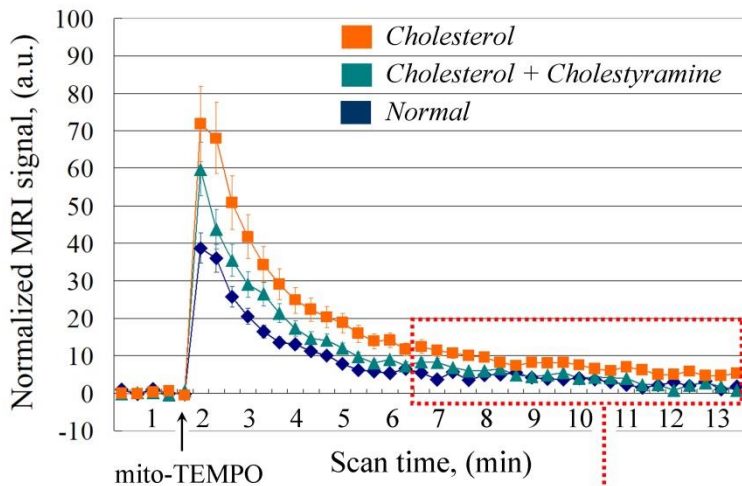
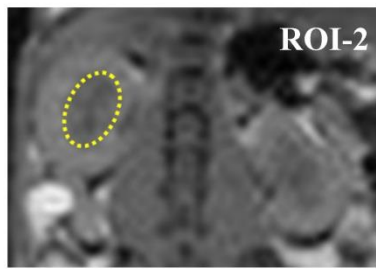
При групата мишки на холестеролна диета се наблюдава значително повишаване на MRI сигнала след инжектиране на контрастната субстанция (Фигура 17В). Интензитетът на сигнала е много висок в първите 1÷3 минути и намалява през следващите 15 минути, но остава над базовата линия. Причината за това, вероятно е наличие на нитроксида в неговата парамагнитна форма, което може да се обясни с висок окислителен капацитет на бъбречните тъкани и, преди всичко с наличие

на високи нива на супероксид. При третата група животни – на холестролна диета и приемащи холестирамин, усилването на сигнала непосредствено след инжектирането на mito-TEMPO, е много добре изразено, но сигналът изчезва след 10 минути (Фигура 17C). Този резултат показва, че бъбречните тъкани имат по-нисък окислителен капацитет и по-висок редуциращ такъв, в сравнение с групата на холестерол, която не приема препарат, намаляващ нивата на холестерола.

Кинетичните криви на нитроксид-усиления MRI сигнал са в подкрепа на гореизказаното. Екстрахиран е сигнал от три области на интерес: ROI 1 – цял бъбрек, ROI 2 – медула, ROI 3 – кортекс. В ROI 1 на CD мишките сигналът е дългоживущ и с по-висок интензитет, сравнен с този на ND групата (Фигура 18). Разликите са статистически достоверни, дори и в периода на крайно елиминиране на контраста ($p < 0.05$). Няма статистически достоверна разлика в ROI 1 в интензитета на сигнала (площите под кривите) между CC и ND групите.

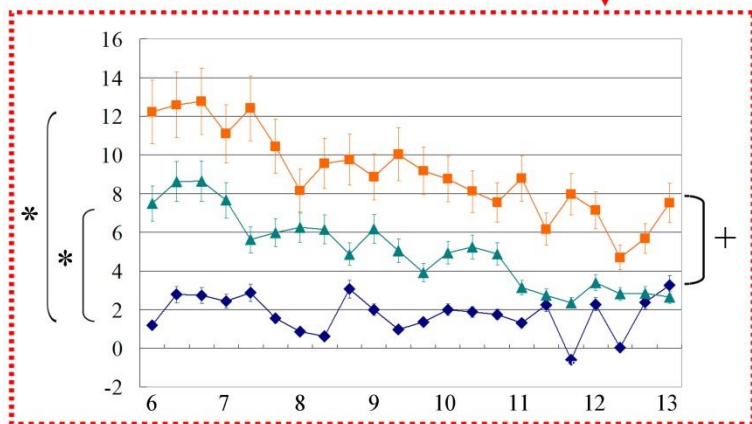
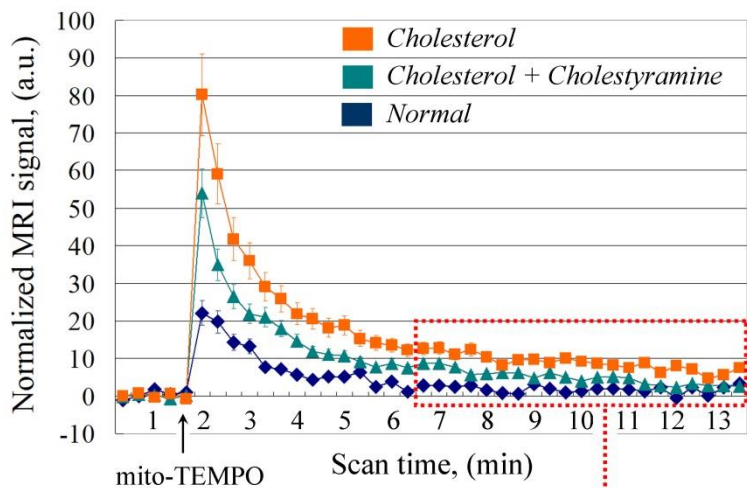
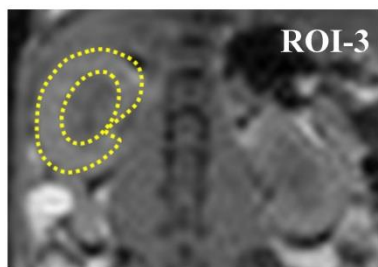


Фигура 18. Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 1 (цял бъбрек) при мишки на нормална диета (ND) (n=5), холестеролна диета (CD) (n=7) и холестеролна диета+ холестирамин (n=7). Данните са представени като средна стойност±SD от броя опитни животни в група. В отделен панел са увеличени частите от кинетичните криви в „периода на елиминиране“. * $p < 0.05$ спрямо ND; + $p < 0.05$ спрямо CD групата.



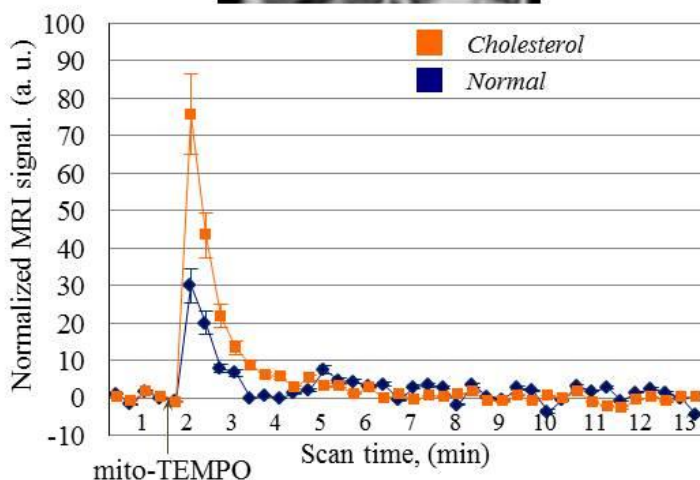
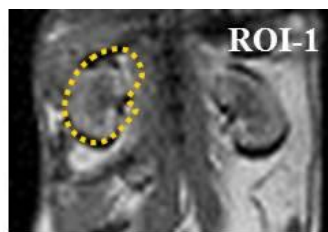
Фигура 19. Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 2 (бъбречна медула) при мишки на нормална диета (ND) (n=5), холестеролна диета (CD) и холестеролна диета+холестир-амин (n=7). Данните са представени като средна стойност±SD от броя опитни животни в група. В отделен панел са увеличени частите от кинетичните криви в „периода на елиминиране“. *p<0.05 спрямо ND; +p<0.05 спрямо CD групата.

В кинетичните криви на нитроксид-усиления MRI сигнал от ROI 2 и ROI 3, обаче, се забелязват различия. В бъбречната медула, кинетиката е сходна на тази от целия бъбрек (Фигура 19), като отново не се наблюдава статистически достоверна разлика в интегрирания MRI сигнал от ROI 2 при CD и ND мишките. В кортекса на бъбрека (ROI 3), сигналят се увеличава в следния ред: ND група < CD група < CD група и разликите са статистически достоверни, дори в периода на крайно елиминиране (Фигура 20). Описаните резултати дават основание да се предположи, че холестираминът напълно елиминира действието на холестерола в медулата, но не и в кортекса. По-високият сигнал в кортекса дава основание да се предположи по-висок окислителен капацитет и риск от патологични изменения в него. Наблюдаваните гломерулни лезии също са в потвърждение на изказаното (Фигура 16).



Фигура 20. Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 3 (бъбречен кортекс) при мишки на нормална диета (ND) (n=5), холестеролна диета (CD) (n=7) и холестеролна диета+ холестирамин (n=7). Данните са представени като средна стойност±SD от броя опитни животни в група. В отделен панел са увеличени частите от кинетичните криви в „периода на елиминиране“. *p<0.05 спрямо ND; +p<0.05 спрямо CD групата.

На Фигура 21 са представени кинетични криви от нитроксид-усилен MRI сигнал при животни на нормална и холестеролна диета на възраст 8 седмици – три седмици след започване на холестеролната диета. Има експериментални данни, които показват, че плазмените нива на общия холестерол и non-HDL-холестерола нарастват значително, докато HDL-холестеролът намалява при мишките на холестеролна диета, в сравнение с групата на нормална диета, дори на този ранен етап от индукция на хиперхолестеролемията (Желев, 2017; Tomizava et al 2011). Кинетичните криви на MRI сигнала не показват съществени промени в динамиката на нитроксид-усиления сигнал, което вероятно означава, че оксидативните промени на този етап са твърде малки. Сигналят е малко по-висок в първите 1-2 минути от инжектирането на спин-сондата в животните на холестеролна диета, но бързо намалява до базовата линия.

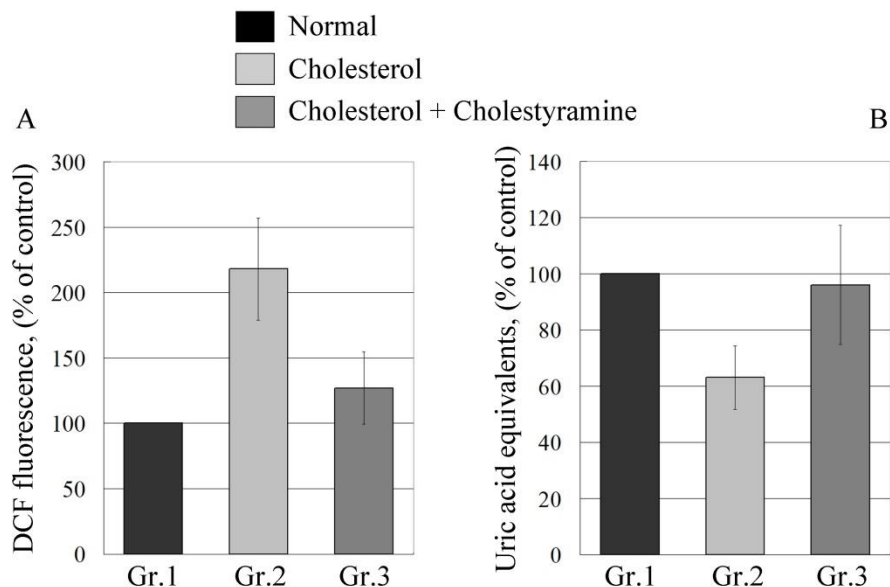


Фигура 21. Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 1 (цял бъбрек) при мишки на нормална диета (ND) (n=3), холестеролна диета (CD) (n=3), на възраст 8 седмици. Данните са представени като средна стойност±SD от броя опитни животни в група.

Много клинични и експериментални изследвания доказват, че хиперхолестеролемията е рисков фактор за развитие на хронични бъбречни заболявания, съпътствани със структурни и функционални промени (Rodriguez-Porcel et al. 2001; Cheng et al. 2003; Domronkitchaiporn et al. 2005; Vogl et al. 2007; Nagata et al. 2010; Kondo et al. 2013). Високите нива на холестерол в кръвния ток и тъканите водят до оксидативен стрес, а в резултат до бъбречна фиброза, тежки увреждания и намалена филтрация (Eddy 1998; Kamanna et al. 1998; Montilla et al. 2006; Hirayama et al., 2008; Okamura et al. 2009; Fang et al. 2016). Хиперхолестеролемията води до значително намаляване на редуцирания глутатион и аскорбата в областта на лезиите – знак за промяна в редокс-баланса (Deera and Varalakshmi 2003; Cachofeiro et al. 2008; Qiao et al. 2009). Аскорбатът и глутатионът „са отговорни“ за бързото затихване на контраст усиления MRI сигнал при здрави бъбреци. От друга страна, индуцираният оксидативен стрес в резултат на хиперхолестеролемията, се съпътства от повишаване на активността на NOX и от митохондриална дисфункция в бъбречните клетки (Gamboa et al. 2016; Wan et al. 2016), която се изразява в свръхпродукция на супероксид. Супероксидът е основен окислител и може да възстанови нитроксид-усиления MRI сигнал (Zhelev et al. 2015; Basic et al. 2016; Maulucci et al. 2016).

Представените на Фигура 22 резултати за оценка на нивата на ROS и тотален антиоксидантен капацитет са получени чрез конвенционални аналитични тестове на изолирани тъканни препарати от бъбреците на мишките, отглеждани при различни режими на хранене. Наблюдава се значително увеличение на ROS и намаляване на антиоксидантния

капацитет при CD мишките, в сравнение с ND групата. Съвсем слабо увеличение на ROS се наблюдава при CC групата, а антиоксидантният капацитет е на контролни нива. Тези данни показват развитие на оксидативен стрес при мишки с хиперхолестеролемия и нормален редокс-статус при мишки, приемали и холестирамин.



Фигура 22. Нива на ROS (A) и тотален антиоксидантен капацитет (B) на бъбреци, получени на изолирани тъканни препарати *in vitro*. Данните са представени като средна стойност \pm SD от броя опитни животни в група (n=5). Животните са на възраст 20 седмици.

Навлизането в тъканите на нитроксида и нивото на извеждането му от организма е друг важен фактор, който може да повлияе динамиката на MRI сигнала.

През 1983 г. Браш изследва динамиката на нитроксид-усиления MRI сигнал в бъбреци на здрави животни и на животни с експериментално индуцирана бъбречна исхемия и хидронефроза (Brash, 1983). Авторът използва амфифилен нитроксиден радикал TES, който преминава в клетките и тъканите. Установен е повишен интензитет на сигнала в увредените тъкани, в сравнение със здравите. Тези резултати са обяснени с нарушаване на васкуларния пермеабилитет и увеличаване на проникването на нитроксида в лезиите. Авторите не дискутират редокс-статуса в областта на лезиите и потенциалния им ефект върху редокс-статуса на спин-сондата, респективно върху динамиката на MRI сигнала. Добре известно е, че бъбречната исхемия и хидронефрозата са съпътствани от остър оксидативен стрес в бъбреците, който се дължи основно на митохондриална дисфункция (Kettler et al. 2003; Ruiz et al. 2005; Malek and Nematbakhsh 2015; Rovcanin et al. 2016; Baligard et al. 2017; Stokman et al. 2017). Голям брой изследвания също показват

намаляване на перфузията в увредените бъбреци (Mathew et al. 2007; Baligard et al. 2017), което предполага по-трудно проникване на контрастния агент в тези органи. Следователно, увеличеният контраст от TES, най-вероятно е резултат от оксидативен стрес и наличие на нитроксида основно в радикалова форма.

Счита се, че промени в структурата и функцията на бъбречните клетки, причинени от хиперхолестеролия, са предшествани от промени във васкуларитета на бъбречния кортекс в началните фази на хиперхолестеролията (Kettler et al. 2003). Томизава и съавтори също показват, че бъбречната дисфункция, индуцирана вследствие хиперхолестеролия, се характеризира с гломерулосклероза и дегенерация на проксималните тубули (Tomizawa et al. 2011a). При същия експериментален модел, авторите не наблюдават усилване на MRI сигнала, но са използвали нитроксид СМРх като контрастна субстанция, който практически не преминава в клетката *in vivo*. Поради хидрофилния си характер, спин-сондата СМРх прониква много трудно и бавно в бъбречните клетки и този процес се конкурира от сравнително бързата екскреция на веществото от организма. Авторите обясняват липсата на нитроксид-усилен MRI сигнал в бъбреците на болните животни с намаляването на филтрацията на СМРх, поради тяхното увреждане в резултат на хиперхолестеролията. Направен е извод, че СМРх е подходяща контрастна субстанция за визуализиране на тази аномалия, чрез използване на MRI. Невъзможността му да проникне в клетките, обаче, не го прави подходящ като редокс-сензор за клетки и тъкани (Желев, 2017).

Всички тези данни дават индиректни доказателства, че по-високият интензитет на MRI сигнала от mito-ТЕМРО в бъбреците на CD мишките се дължи основно на по-високата окислителна способност на бъбречните тъкани, в сравнение с тази на тъканите на здравите мишки.

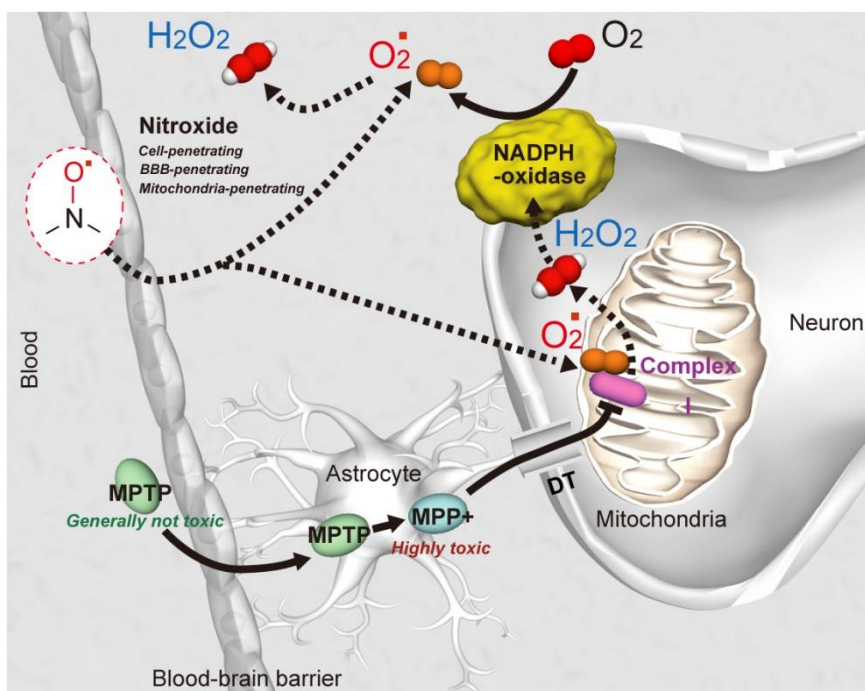
Цикличните нитроксиди са нискотоксични (по-безопасни от гадолиниевите комплекси) и не са мутагенни, което ги прави потенциални кандидати за нови контрастни субстанции за изследване на редокс-статуса при хора с използване на MRI. Някои от тях вече са във фаза на клинични проучвания, но в други области на медицината (Zarlin et al. 2015). Необходимо е обаче, тяхното приложение в клиничната практика да бъде предварително прецизирано от гледна точка на специфичните им свойства, проникване в клетката и безопасна доза. В този контекст, нашите изследвания показват, че по-високата степен на редукция на пиперидиновите нитроксиди, които проникват в клетката, не трябва да се счита за недостатък. Това предоставя нови възможности за MRI/EPR анализи на метаболитни пътища, придружени от минимални промени в

редуциращия капацитет на биологичните обекти.

IV. Изследване на възможността за визуализиране на тъканния редокс-статус в кортекса и допаминергичната област на мозъка на мишки с експериментален модел на паркинсонизъм, чрез използване на нитроксид-усилен MRI

Болестта на Паркинсон е невродегенеративно заболяване с неизвестна етиология. Проявява се като дегенерация на допаминергичните неврони в substantia nigra pars compacta (SNpc) на мозъка, което е съпроводено от дефицит на допамин (Jackson-Lewis et al, 2007). Понастоящем не са изяснени както причината, така и механизмът за загубата на допаминергичните неврони. Основните дискуссионни въпроси по отношение на допаминовата дегенерация са защо и как тези специфични неврони умират при болестта на Паркинсон. Въпреки, че многобройните изследвания на проби от аутопсии на пациенти с болестта на Паркинсон имат своето място за отговор на тези въпроси, резултатите реално се отнасят за крайния стадий на заболяването (Jackson-Lewis et al, 2007). По тази причина, тези резултати не са приложими за ранна диагностика на етапите на невродегенерацията.

В настоящите експерименти е визуализирана продукцията на супероксидни радикали в допаминергичната област на мозъка при болестта на Паркинсон. Използван е модел на болестта на Паркинсон на мишки, третирани с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин (MPTP) – „MPTP-третирани мишки“ (Jackson-Lewis et al., 2007; Vila et al., 2003). MPTP е междинен продукт от синтезата на мепиридинов аналог с хероин-подобни ефекти, който може да предизвика паркинсонов синдром при хора, с почти неразличими симптоми от болестта на Паркинсон. MPTP е единствения познат допаминоз токсин, способен да причини значими и продължителни поражения на нигростриалните допаминергични пътища, с клнична картина на паркинсонизъм при бозайници (хора, примати, мишки). Регистрирани са различни биохимични промени, часове преди отмирането на допаминергичните неврони при третиране на мишки с MPTP: нарушения в енергийния метаболизъм (напр., митохондриална дисфункция), активиране на NOX, генериране на активни форми на кислорода (ROS) и смущения в калциевата хомеостаза (Przedborski et al., 2005; Chinta et al., 2008; Yan et al 2013), като се предполага, че е възможно тези начални събития да са вътреклетъчни сигнали, които активират молекулни каскади (напр. апоптоза), отговорни за отмирането на допаминозите неврони.

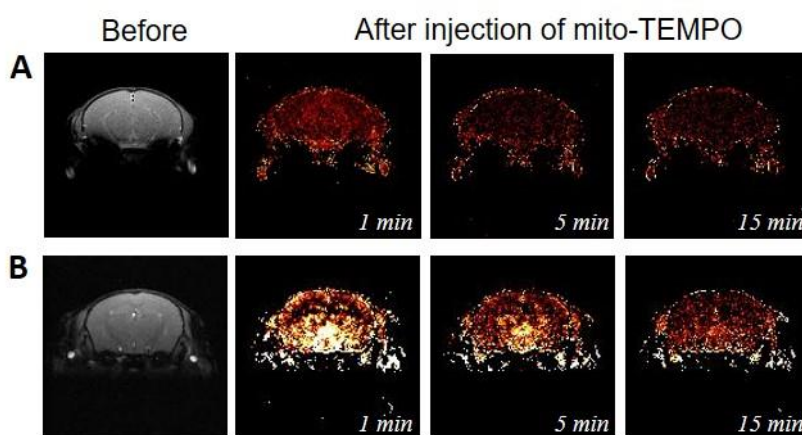


Фигура 23. Молекулен механизъм на индуциране на паркинсонизъм с МРТР (Vila & Przedborski, 2003) и регистриране на супероксид с използване на нитроксидни радикали, преминаващи кръвно-мозъчната бариера (КМБ). DT – допаминов транспортер; MPP+ – 1-метил-4-фенилпиридин; МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин; $O_2^{\bullet -}$ – супероксид; H_2O_2 – водороден пероксид.

Предполагаемият молекулен механизъм, доказващ дефекти в митохондриалната електрон-транспортна верига, след третиране с МРТР, е описан от Vila & Przedborski и е представен на Фигура 23. МРТР е нетоксичен протоксин. При системно приложение той бързо преминава през кръвно-мозъчната бариера и се метаболизира до 1-метил-4-фенил-2,3-дихидропиридин (МРТР+) от моноамиоксидаза В (MAO-B) в недопаминовите клетки, след което, вероятно вследствие на спонтанно окисление, се превръща в 1-метил-4-фенилпиридин (MPP+). MPP+ е токсично съединение с висок афинитет към протеина, отговорен за транспорта на допамина в невроните. По този начин MPP+ прониква в допаминовите неврони, концентрира се в митохондриите, където инхибира Комплекс-I от електрон-транспортната верига и възпрепятства нейните функции. Инхибирането на Комплекс-I затруднява потока на електрони по митохондриалната електрон-транспортна верига, в резултат на което се увеличава продукцията на ROS от митохондриите (предимно супероксид и/или водороден пероксид). Високите нива на ROS водят до активиране на NADPH-зависимите оксидази, което причинява оксидативен стрес и индукция на апоптоза и некроза на невроните. Това е един от най-често дискутираните молекулни механизми на увреждане на допаминовите неврони.

Понастоящем няма универсална методика за директна визуализация *in vivo* на началните етапи на оксидативен стрес в допаминовата област на мозъка (на интактни животни), причинени от прилагането на МРТР. В по-ранни публикации, посветени основно на модели на карцином, е показано, че някои нитроксидни производни, проникващи в клетките (TEMPO, TEMPO-белязана нитрозоурея), са подходящи молекулни сензори за детекция на ROS (по-специално на супероксидни радикали) в тъкани *in vivo*, с използване на магнитно-резонансна томография (MRI) и електронен-парамагнитен резонанс (EPR) (Bakalova et al., 2013; Zhelev et al., 2013). Тези нитроксидни производни преминават и през кръвно-мозъчната бариера, което ги прави подходящи молекулни сензори за детекция на ROS в мозъка (Zhelev et al., 2009).

В настоящото изследване е използван нитроксиден радикал – mito-TEMPO, за визуализиране на продукцията на супероксид в допаминергичната област на мозъка при МРТР-третиранни мишки.

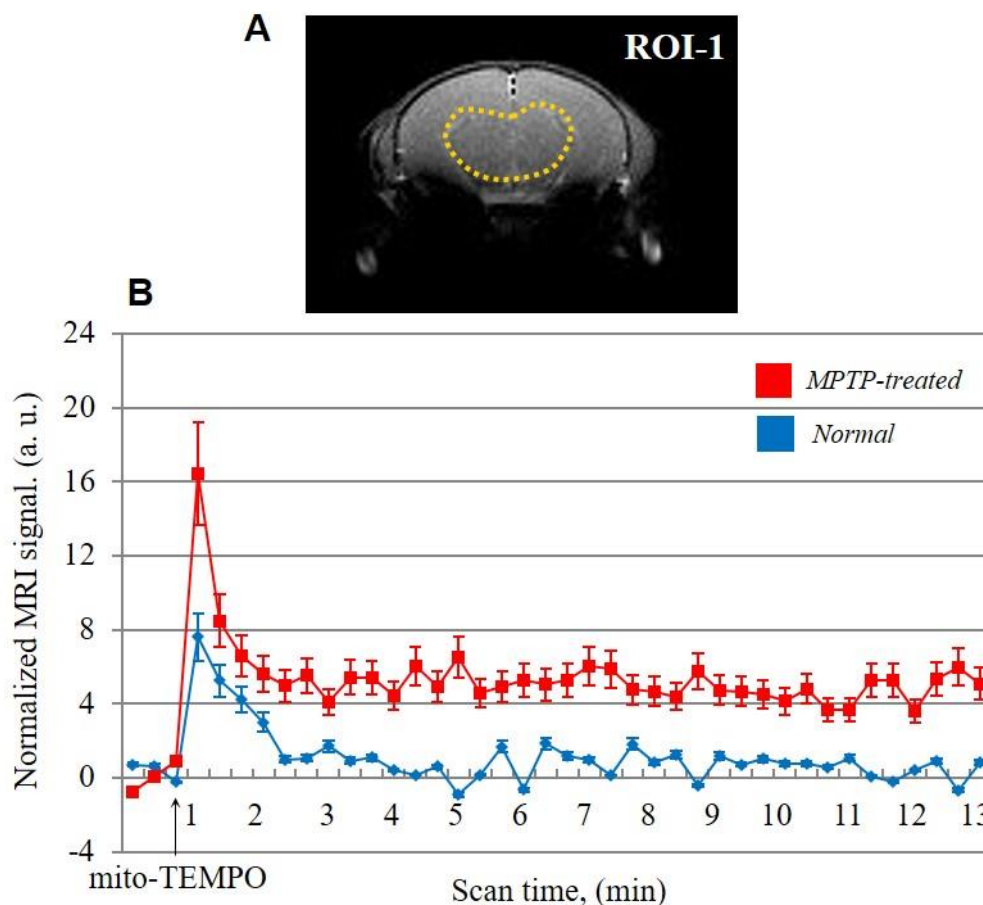


Фигура 24. Нитроксид-усилен MRI сигнал при здрави (A) и МРТР-третиранни мишки (B), с използване на mito-TEMPO. Черно-бели изображения: Анатомични MRI изображения на мозък, преди инжектиране на mito-TEMPO. Цветни изображения: Екстрахиран нитроксид-усилен MRI сигнал, регистриран на 1-та, 5-та, 15-та минути след инжектиране на mito-TEMPO.

На Фигура 24 са представени изображения от нитроксид-усилен MRI сигнал на здрави и МРТР-третиранни мишки. Допаминергичната област на мозъка (срез, който включва SNpc) е избрана като „област на интерес“ (ROI). При контролните животни MRI сигналът се увеличава след инжектиране на mito-TEMPO, като сигналът изчезва напълно след 3 минути (Фигура 24A). Кинетичните криви на MRI сигнала, представени на Фигура 25B (кинетичната крива в синьо), потвърждават описаното – силно увеличаване на сигнала след инжектиране на нитроксида с последващ бърз спад до началното ниво. Усилването на сигнала в началния момент (непосредствено след инжектирането на mito-TEMPO)

се дължи на преминаването и натрупването на нитроксидния радикал в мозъчните тъкани, докато последващото намаляване е обусловено от редукцията му до диамагнитния хидроксиламин, която протича основно в мозъчните клетки. Времето на полуживот на нитроксид-усиления MRI сигнал в този случай е приблизително 45 секунди, а продължителността му до достигане на базовото ниво е около 1 минути 20 секунди. Резултатите от хистограмата показват висока редуцираща активност на нормалните (здрави) мозъчни тъкани спрямо mito-TEMPO.

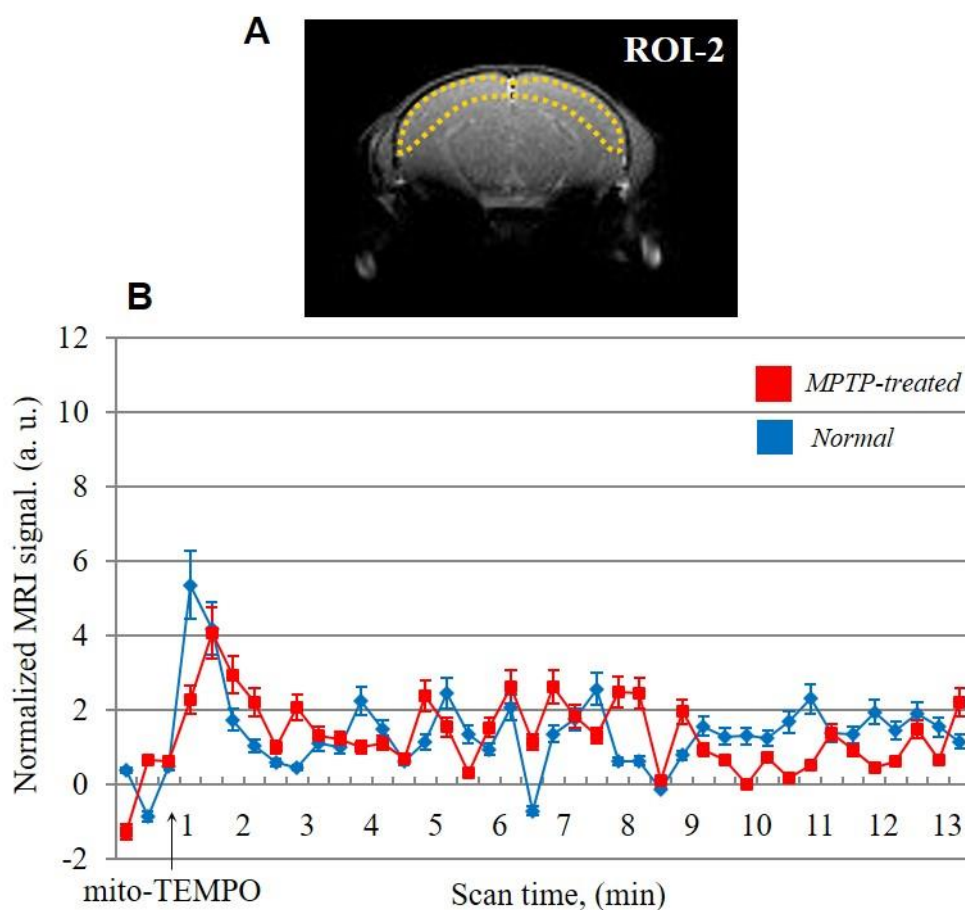
При МРТР-третираните мишки се регистрира по-силен и дългоживущ нитроксид-усилен MRI сигнал в допаминергичната област на мозъка след инжектиране на мито-TEMPO (Фигура 24В). Профилът на кинетичната крива на MRI сигнала в мозъка се различава от този, отчетен при контролната група животни (Фигура 25В) (кинетичната крива в червено). При МРТР-третираните мишки сигналът се увеличава след инжектирането на mito-TEMPO, а впоследствие интензитетът му намалява с около 50% и достига плато, без последващ спад до началното ниво в рамките на 15 минути. При продължително скениране е установено, че времетраенето на нитроксид-усиления MRI сигнал е повече от 20 минути ($p < 0.001$ спрямо контролата).



Фигура 25. Нитроксид-усилен MRI сигнал при здрави и МРТР-третирани мишки, с използване на mito-TEMPO. (А) MRI изображения на мозък на МРТР-третирани

мишки с означена „област на интерес” (ROI) с пунктирни линии – допаминергична област на мозъка. (B) Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 1 при здрави мишки (кривата в синьо) и МРTP-третираните мишки (кривата в червено). Интензитетът на MRI сигнала в допаминергичната област на мозъка при МРTP-третираните животни е по-висок (и на 15^{та} минута), в сравнение с този при контролната група животни. Данните са представени като средна стойност±SD от 6 броя опитни животни във всяка група.

На Фигура 26 са представени кинетични криви от нитроксид-усилен MRI сигнал с избрана ROI – кортекса на мозъка. Динамиката на MRI сигнала показва незначително увеличаване в кортекса на контролните и МРTP-третираните мишки, непосредствено след инжектиране на контраста. Впоследствие и при двете групи животни сигналят достига начални нива, като кривите имат идентичен ход.



Фигура 26. Нитроксид-усилен MRI сигнал при здрави и МРTP-третираните мишки, с използване на mito-TEMPO. (A) MRI изображения на мозък на МРTP-третираните мишки с означена „област на интерес” (ROI) с пунктирни линии – кортекс на мозъка. (B) Кинетични криви на нитроксид-усилен MRI сигнал в ROI 2 при здрави мишки (кривата в синьо) и МРTP-третираните мишки (кривата в червено). Интензитетът на MRI сигнала в кортекса на мозъка при МРTP-третираните животни не показва

разлики, в сравнение с този при контролната група животни. Данните са представени като средна стойност \pm SD от 6 броя опитни животни във всяка група.

От гореизложеното може да се направи извод, че наблюдаваните разлики в кинетиките на кривите при здрави и МРТР-третираните мишки се дължат на промени в редокс-статуса на тъканите в допаминергичната област на мозъка, поради специфичните ефекти на невротоксина и дегенерация само на допаминергичните неврони. Хистограмите показват по-висока окислителна способност в богатата на митохондрии допаминергична област на МРТР-третираните мишки, която най-вероятно се дължи на свръхпродукцията на супероксид.

Получените резултати дават основание да се предположи, че mito-TEMPO прониква в тъканите на мозъка и участва в редокс-трансформации. Динамиката на контрастните свойства на mito-TEMPO са свързани с наличието на два противоположни процеса в неговия редокс-цикъл. При редукцията на mito-TEMPO до хидроксиламин се получава загуба на нитроксид-усиления MRI сигнал и обратно, взаимодействието на хидроксиламина със супероксидния радикал възстановява радикаловата форма на mito-TEMPO, респективно нитроксид-усиления MRI сигнал.

В заключение може да кажем, че mito-TEMPO е подходящ редокс-сензор за визуализиране и анализ на продукцията на супероксидни радикали в допаминергичната област на мозъка при Паркинсонова болест, с използване на MRI.

ИЗВОДИ

1. Потвърдено е участието на супероксидните радикали в съкращаване времето на релаксация на протоните на водните молекули и повишаване на MRI контраста на водата.
2. Потвърдено е участието на водородния пероксид в понижаване на MRI контраста на водата.
3. Установено е, на изолирани нормални и ракови клетъчни линии с еднакъв произход, че пролиферативната активност корелира с динамиката и интензитета на EPR сигнала на нитроксидния радикал mito-TEMPO. EPR сигналът на спин-сондата намалява с понижаване на пролиферативната активност, което е доказателство за нарастване на редуциращия капацитет на клетките.

4. Динамиката и интензитетът на EPR сигнала на mito-TEMPO корелира с нивото на вътреклетъчния супероксид, водородния пероксид и общия антиоксидантен капацитет на клетките.
5. Визуализиран е тъканният редокс-статус на експериментални животни с хиперхолестеролемия, чрез използване на нитроксид-усилен MRI *in vivo* и mito-TEMPO, като контрастна субстанция. Установено е повишаване на MRI контраста, респ. повишаване на оксидативния капацитет на кортекса на бъбреците, при животните с хиперхолестеролемия, в сравнение със здравите животни.
6. Визуализиран е тъканният редокс-статус на експериментални животни с паркинсонизъм, чрез използване на нитроксид-усилен MRI *in vivo*. Потвърдено е повишаване на MRI контраста в допаминергичната област на мозъка, но не и в областта на кортекса при животните с паркинсонизъм, в сравнение със здравите животни.

ПРИНОСИ

1. Разработен е нов методичен подход с използване на EPR за идентифициране на изолирани култивирани клетъчни линии с еднакъв произход, но различна пролиферативна активност. Методът се базира на динамиката на EPR контраста на нитроксидния радикал mito-TEMPO в клетъчните суспензии и дава възможност за оценка на нивото на вътреклетъчния супероксид в абсолютни единици.
2. Разработен е нов методичен подход за ранна диагностика на бъбречни увреждания *in vivo*, на базата на промени в тъканния редокс-статус, индуцирани чрез хиперхолестеролемия. Методът се базира на динамиката на MRI контраста на нитроксидния радикал mito-TEMPO в реналния кортекс при развитие на гломерулосклероза и повишаване на оксидативния капацитет на клетките в тази област.
3. Доказана е възможността за използване на mito-TEMPO като нова контрастна субстанция за ранна диагностика на бъбречни увреждания чрез нитроксид-усилена урография.

Приносите са с подчертано приложен характер.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикации в чужди и български списания с импакт фактор:

1. **Lazarova D.**, S. Shibata, I. Ishii, G. Zlateva, Z. Zhelev, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova (2019) Nitroxide-enhanced magnetic resonance imaging of kidney dysfunction *in vivo*, based on redox-imbalance and oxidative stress, *Gen. Physiol. and Biophys.*, (accepted for publication) (impact factor – 1.479).
2. **Lazarova D.**, S. Shibata, I. Ishii, G. Zlateva, Z. Zhelev, I. Aoki, R. Bakalova (2019) Imaging of redox-imbalance and oxidative stress in kidney *in vivo*, induced by dietary cholesterol, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, (accepted for publication) (impact factor – 1.227).
3. Ivanova D., R. Bakalova, **D. Lazarova**, V. Gadjeva, Z. Zhelev (2013) The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. *Adv. Clin. Exp. Med.* 22(6), 899-908 (impact factor – 1.262).
4. Zhelev Z., R. Bakalova, I. Aoki, **D. Lazarova**, T. Saga (2013) Imaging of superoxide generation in the dopaminergic area of the brain in Parkinson's disease, using mito-TEMPO. *ASC Chem. Neurosci.* 4(11), 1439-1445 (impact factor – 4.936).

Публикации в реферирани чужди и български списания и сборници в пълен текст без импакт фактор:

5. Bakalova R., **D. Lazarova**, G. Zlateva, Z. Zhelev, L. Spassov, I. Aoki (2017) Visualization of overproduction of superoxide in living cells using nitroxide-enhanced magnetic resonance imaging – new insight on the molecular nature of the functional MRI, *Ann. Sof. Univ. "St. Kliment Ohridski"*, Faculty of Medicine, 2, 123-134.
6. Ivanova D., E. Georgieva, **D. Lazarova**, V. Gadjeva, R. Bakalova, Z. Zhelev (2014) Redox-modulating and/or antioxidant properties of nitroxides – a potential reason for decreasing side-effects of cancer therapy, *Trakia J. Sci.* (3), 329-337 (in English).

Участия в научни форуми:

1. **Лазарова Д.,** Д. Иванова, Р. Бакалова, Г. Златева, И. Аоки, Ж. Желев – Крос-сигнализация между тъканния редокс-статус, антиоксидантния капацитет и матриксните металопроотеинази в ранен и терминален стадий на тумори, 24^{та} Международна научна конференция, Стара Загора, България, 5-6 юни 2014 (на английски).
2. Georgieva E., D. Ivanova, **D. Lazarova**, R. Bakalova, I. Aoki, Z. Zhelev – *In vitro* analysis of redox-status of normal and tumor cells using nitroxide radicals and EPR spectroscopy, 9th International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Greece, October 6-10, 2014.
3. **Лазарова Д.,** И. Аоки, Р. Бакалова – Презентация на тема: Молекулярна образна диагностика на невродегенеративни увреждания и туморогенеза на базата на промени в тъканния редокс-статус на експериментални модели *in vivo*, с използване на магнитно-резонансна томография, позитрон-емисионна томография и флуоресцентен имиджинг. Заключителна научна школа и борса за научни идеи, организирана по проект: BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес” по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, Хисар, България, 29 октомври - 01 ноември 2014.
4. **Lazarova D.,** D. Ivanova, S. Semkova, A. Danailova, G. Zlateva, Z. Zhelev, R. Bakalova – Cytotoxicity of SN38, EF24 and their combination on colon cancer cells: “Oncogenic” versus “Onco-suppressive” reactive oxygen species, XXVII Международна научна конференция, организирана от Съюз на учените, Стара Загора, България, 01-02 юни 2017.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА (приложени към документите по защитата): 73

ABSTRACT

Tissue redox-status is defined as the balance between endogenous redox-active components: oxidants (e.g. reactive oxygen and nitrogen species) and reducing equivalents (antioxidant systems, thiol-containing proteins, endogenous redox-pairs, etc.). The ratio between endogenous oxidants and reducing equivalents determines the regulation of cell signaling in the organism, maintaining cellular homeostasis within normal limits. Disturbance of the redox-balance in cells, tissues and body fluids is closely interconnected to the pathogenesis of many diseases: carcinogenesis, neurodegenerative and autoimmune diseases, atherosclerosis, inflammatory processes, etc.

For the study of the redox-status of biological objects, different methodological approaches are used, with a large number of them applying contrast agents that can be directed to targets (localized to a particular cellular structure). Registration with high sensitivity and resolution of most of them (e.g. fluorescent contrast agents) is only possible *in vitro* but is difficult to apply *in vivo*.

Radionuclides as contrasts in positron emission tomography (PET) are applied *in vivo*, resulting in extremely high sensitivity but low resolution. However, they give indirect information about tissue redox-status, based on its relation to various biochemical and physiological processes, for example: glucose or oxygen consumption, hypoxia, and others. Another major disadvantage of these contrasts is that they are radioactive and the ionizing radiation emitted by them, creates additional risk for the patient.

It should be noted that the abovementioned methodological approaches allow assessment of the redox-status of biological objects, based on the information obtained for one or several redox-active compounds, and so the analysis of the results and their conclusions are often contradictory.

Currently, researchers' efforts are focused on "mapping" the tissue and organ redox-status. The most appropriate methodology should provide direct and non-invasive *in vivo* registration of this parameter. Very promising in this regard are the cyclic nitroxide radicals and the nitroxide-enhanced magnetic resonance techniques, which can be applied both *in vitro* and *in vivo*, and are characterized by high sensitivity and high resolution.

The goal of this dissertation thesis is to: Develop contrast-enhanced magnetic resonance methods for visualizing pathologies related to cellular redox imbalance.

The literature review includes a description of: (1) the physical principles of magnetic resonance imaging techniques; (2) the redox-status of cells and tissues; (3) the current state of methodological approaches for visualizing and analyzing the redox-status of biological objects – redox-sensors and nitroxide-enhanced magnetic resonance techniques.

Results and discussion are split in four parts:

1. Effects of endogenous oxidizers and reducers on the nitroxide-enhanced MRI/EPR signal in model cell-free systems.
2. Application of nitroxide-enhanced EPR to visualize and assess the cellular redox-status of isolated cell lines (with a different proliferative index) *in vitro*.
3. Visualization of tissue redox-status in kidney of mice with an experimental model of hypercholesterolemia using MRI and mito-TEMPO as a contrast substance.
4. Visualization of tissue redox-status in cortex and dopaminergic brain region of mice with an experimental model of Parkinsonism using nitroxide-enhanced MRI.

The conclusions and contributions are summarized and presented at the end of the dissertation.