

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Албена Йорданова - Софийски университет „Св. Климент Охридски“,
Медицински факултет, Катедра Химия и биохимия, физиология и патофизиология

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Професионално направление: 4.1 Физически науки

Научна специалност: Биофизика

Автор: Десислава Анри Лазарова

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: Катедра „Физика на кондензираната материя“, Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Тема: „Контраст-усилени магнитно-резонансни техники за визуализиране на патологии, свързани с нарушения в клетъчния редокс-статус“

Научни ръководители: проф. дбн Румяна Бакалова-Желева и доц. Геноева Златева, дф

В представения ми за рецензия дисертационен труд на ас. Десислава Анри Лазарова е изследван актуален проблем, свързан с изследване на редокс-статуса на тъкани и органи в *in vivo* и *in vitro* условия. За целта са използвани за първи път циклични нитроксидни радикали в комбинация с нитроксид-усилени магнитно-резонансни техники – магнитно-резонансна томография и имиджинг (MRI) и електронен парамагнитен резонанс (EPR)] - методи с висока чувствителност и резолюция. Известно е, че регулацията на клетъчната редокс-сигнализация е един от факторите за поддържане на клетъчната хомеостаза в нормални граници. Здравите клетки и тъкани се характеризират с ниски концентрации на активните форми на кислорода (ROS) и постоянно ниво на редуциращите еквиваленти. Ето защо промените в оптималния редокс-баланс в клетките, регистрирани чрез редокс-имиджинг, са индикация за възникване на редица заболявания, напр. невро-дегенеративни и автоимунни заболявания, канцерогенеза, възпалителни процеси и др.

Дисертационният труд е оформен изключително старателно и дава отлична представа за извършените от докторантката изследвания. Той съдържа 95 страници, 39

фигури и 1 таблица. Цитирани са 144 литературни източници предимно от чуждестранни автори.

В *Литературния обзор* е направен задълбочен анализ на разглеждания проблем, като подробно са разгледани физичните принципи на основните магнитно-резонансни образни диагностични техники (ЯМР, ЕПМР), клетъчния редокс-статус, основните ендогенни източници на реактивните форми на кислорода (ROS) и механизмите за тяхното обезвреждане. Особено внимание в дисертационния труд е отделено на използването на редокс-сензори и нитроксид-усилени магнитно-резонансни техники за визуализиране и анализ на редокс-статуса, респективно и нивата на оксидативен стрес, което е от значение за диагностициране и проследяване на различни заболявания като Алцхаймер, болест на Паркинсон, инфаркт и др. Литературният обзор е изчерпателен и богат илюстриран, така че последователно въвежда читателя към изследователската цел, която Десислава Лазарова си е поставила: разработване на контраст-усилени магнитно-резонансни методи за визуализиране на патологии, свързани с нарушения на клетъчния редокс-статус. Задачите са ясно обобщени в 4 основни направления, включващи изследване на ефекта на ендогенни окислителни и редуктори върху нитроксид-усилени MRI/EPR сигнал на моделни безклетъчни системи; прилагане на нитроксид-усилени EPR за визуализиране и оценка на клетъчния редокс-статус на изолирани клетъчни линии в условия *in vitro*; визуализиране на тъканния редокс-статус при мишки с експериментални модели на хиперхолестеролемия и паркинсонизъм. Поставените задачи за реализация са ясно формулирани и се явяват база за представянето и интерпретирането на получените в дисертационния труд резултати.

Разделът *Материали и методи* включва 13 страници, в които подробно са описани използваните консумативи и реагенти, както и препаративните и аналитични методи за визуализиране и анализ на редокс-статуса на тестваните клетъчни линии и тъкани.

Получените резултати и дискусия са анализирани на 38 страници. В резултат на прецизно проведени експерименти са изследвани ефектите на ендогенни окислителни върху нитроксид-усилени MRI сигнал на моделни безклетъчни системи - калиев супероксид и водороден пероксид, като за контрастна субстанция е използвана спин-сондата mito-TEMPO, проникваща през клетъчните и митохондриалните мембрани. Направени са и контролни експерименти, които показват измененията на EPR сигнала на mito-TEMPO в присъствие на различни редуктори – аскорбат, NADH, NADPH и глутатион.

При проведените *in vitro* експерименти чрез EPR спектроскопия на изолирани клетъчни линии е оценен и сравнен редокс-статуса на нормални и 3 вида ракови епителни клетки, изолирани от лигавицата на дебелото черво с различна степен на проли-

ферация и диференциация. Получените резултати потвърждават наличието на оксидативен стрес в раковите клетки, в резултат на необратими нарушения в редокс-статуса им. В допълнение, нитроксид-усиления EPR сигнал с mito-ТЕМРО показва недвусмислено, че с увеличаване нивото на диференциация и инвазивност на туморните клетки нараства и свързването на ROS. Нивата на окислителните еквиваленти при раковите клетки и тяхната корелация с нитроксид-усиления EPR сигнал са потвърдени категорично и с други 4 конвенционални аналитични тестове (включващи анализи на хидропероксида, цитозолен и митохондриален супероксид и анализ на общия антиоксидантен (редуциращ) капацитет на биологични проби), което е доказателство за адекватното приложение на mito-ТЕМРО като подходящ редокс-сензор при изследване редокс-статуса на клетките.

В представения ми за рецензия дисертационен труд особено ценни в приложен аспект са изследванията, свързани с визуализиране на тъканния редокс-статус при бъбречни увреждания при мишки, чрез използване на MRI и mito-ТЕМРО като контрастна субстанция. Бъбречната дисфункция е предизвикана от диета, водеща до хиперхолестеролемия и гломерулосклероза, а в допълнение са проведени експерименти с група мишки, които след 15-дневна холестеролна диета са третирани с антилипидемичния препарат холестирамин, който се свързва с жлъчните киселини и инхибира тяхната реабсорбция в тънкото черво. Нитроксид-усиленият MRI сигнал на бъбреци на мишки на нормална диета, холестеролна диета и с прилагане на холестирамин (след инжектиране на mito-ТЕМРО) показват недвусмислено, че по-високият интензитет на MRI сигнала в бъбреците на мишки с хиперхолестеролемия е в резултат на повишените нива на ROS в бъбречните тъкани, в сравнение с тази на тъканите на здравите мишки. Ефектът от прилагането на холестирамин е регистриран чрез MRI, като се наблюдава понижен интензитет на MRI сигнала. В допълнение са изследвани и кинетичните криви на нитроксид-усиления MRI сигнал в цял бъбрек, бъбречна медула и бъбречен кортекс. Получените резултати демонстрират локалния ефект от прилагането на холестирамин, който напълно елиминира действието на холестерола в медулата, но не и в бъбречния кортекс на изследваните животни, което предполага по-висок окислителен капацитет и риск от патологични изменения в кортекса.

В допълнение, за потвърждаване ефективността от прилагането на mito-ТЕМРО като удобен редокс-сензор в образната диагностика (преминаващ и през кръвно-мозъчната бариера) е визуализиран тъканният редокс-статус в кортекса и допаминергичната област на мозъка на 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин (МРТР)-третирани мишки с експериментален модел на паркинсонизъм. Установено е, че

кинетичната крива на MRI сигнала в допаминергичната им област на мозъка след инжектиране на mito-TEMPO се различава от детектираните в контролната група. За разлика от допаминергичната област на мозъка регистрираните кинетични криви в кортекса на мозъка показват незначителни различия между контролните и МРТР-третираните мишки. С тези експерименти са потвърдени измененията в редокс-статуса на тъканите в допаминергичната област на мозъка, най-вероятно поради невротоксичните ефекти на МРТР и дегенерация само на допаминергичните неврони. Получените резултати в дисертационния труд демонстрират възможностите на редокс-имиджинга с висока резолюция и пряка детекция на свръхпродукция на ROS в живи клетки и тъкани като многообещаващ нов подход в образната диагностика и клиничната практика.

Научните приноси от проведените изследвания са обобщени в 3 основни направления с подчертано приложен характер в образно-диагностичните изследвания при бъбречни увреждания, чрез използване на спин-сондата mito-TEMPO.

Резултатите от разработката на дисертационния труд, са публикувани в 6 научни статии. Четири от публикациите са в списания с импакт фактор, като две от тях, където дисертантката е първи автор, са приети за печат. Общият импакт-фактор от публикациите е 8,904. Забелязани са 73 цитата на публикациите на докторантката. Резултатите са представени на 4 научни форума у нас и в чужбина.

Представеният автореферат на дисертационния труд на ас. Десислава Лазарова е оформен отлично, отговаря напълно на съдържанието на дисертацията и дава пълна информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на изследванията.

Имам следните забележки и въпроси към дисертантката, относно представения дисертационен труд:

1. Ензимът ксантин-оксидаза, катализиращ превръщането на хипоксантина в пикочна киселина при разграждането на пурините, е описан като хидроксилаза (стр. 24 в дисертационния труд), но той е оксидоредуктаза с ЕС 1.17.3.2. Тази неточност е частично поправена по-нататък в текста, където ензимното му действие е описано вярно.
2. Известно е, че при невродегенеративните заболявания се наблюдават характерните β -амилоидни плаки в мозъка, в резултат на натрупване на амилоидни протеини, както и т.нар. tau-протеини. При използвания в дисертационния труд експериментален модел на болеста на Паркинсон в мишки, при който е установена допаминергичната невродегенерация (стр. 36),

наблюдавани ли са β -амилоидни плаки и има ли категорични доказателства, че третирането с МРТР е подходящ допаминов невротоксин, предизвикващ дегенерация на допаминергичните неврони при болестта на Паркинсон.

3. На стр. 43 е описана EPR-спектроскопия на клетъчни суспензии в *in vitro* условия. От какво зависи продължителността на измерванията, тъй като в текста е посочено, че „измерванията се провеждат по гореописания протокол, за време 1-360 минути (в зависимост от вида на пробата)“.
4. Защо при провеждането на MRI на експериментални животни в *in vivo* условия (стр. 44) се налага използването на различни инхалаторни анестетици – изофлуран при експерименталните модели на хиперхолестеролемия и уретан при експерименталните модели на паркинсонизъм?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От извършената и анализирана научно-изследователска работа мога да обобщя, че Десислава Лазарова е напълно подготвен млад учен за провеждане на задълбочени научни изследвания, притежаващ необходимите експериментални умения и способности да обсъжда получените авторски резултати и да ги съпоставя с литературни източници. С представените публикации и участия в научни форуми тя отговаря на изискванията в Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагането му в Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на дисертантката **Десислава Анри Лазарова** да бъде присъдена образователната и научна степен „доктор“ в професионално направление 4.1 Физически науки, Научна специалност: Биофизика.

25.03.2019 г.

Изготвил рецензията:

/доц. д-р Албена Йорданова/