

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Надка Иванова Бояджиева, д. м. н., член на научно жури в процедурата по защита на дисертационен труд на

Надя Георгиева Христова-Авакумова

на тема:

„Сравнително проучване на влиянието на новосинтезирани структурни аналози на салицилалдехидбензоилхидразона върху свободно-радикални процеси в *in vitro* тест системи”

по докторска програма „Биофизика”, в професионално направление 4.1. Физически науки от област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, на докторанта на самостоятелна подготовка към Катедра по медицинска физика и биофизика на Медицински факултет при МУ – София

Биографични данни за дисертантката

Надя Георгиева Христова-Авакумова е завършила молекулярна биология през 2002 г. на Софийски университет на СУ „Климент Охридски”. През 2008 г. става магистър по биофизика на същия университет. През 2014 г. придобива специалност „биофизика” и от декември 2014 г. е зачислена за докторант на самостоятелна подготовка към катедрата по „Медицински физика и биофизика” на МФ, МУ – София. Чрез конкурс е назначена и работи до настоящем като асистент в същата катедра от 2008 г. Тя има учебна натовареност съгласно изискванията на университета, научен ръководител на дисертационния ѝ труд е доц. Вера Ангелова-Хаджимитова, дбф, която е дългогодишен преподавател и учен с авторитет у нас и в чужбина. Надя Христова-Авакумова владее добре английски и френски език.

Значение и актуалност на проблема

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем в медицината. Съвременен е въпросът за изследване ролята на свободните радикали в развитието на различни заболявания, което определя и търсенето на нови вещества. Посоченото определя и търсенето на нови вещества (антиоксиданти), които да блокират тяхната активност. Свързано с механизмите на оксидативен стрес е и действието на различни вещества, част от които са обект на дисертационния труд. развитието на фармацевтичната химия и синтетичната органична химия доведе до синтезиране на различни съединения, които са обект на задълбочени научни изследвания в света и у

нас. Фармакологичните проучвания в посоченото направление се извършват, както *in vivo*, така и *in vitro*. В настоящият дисертационен труд са в *in vitro* тест системи. Актуалността на изследването се подкрепя и от търсенето на нови механизми за антиоксидантна защита в клетките. В представената дисертация е извършено сравнително проучване на влиянието на новосинтезирани структурни аналози на салицил алдехид бензоил хидразон (SBH) върху свободни радикални процеси в *in vitro* тест системи. Те са в групата на ароилхидразони. Характерни за хидразоните са високата им хидролитична стабилност, силно изразен афинитет към метални йони и способност да образуват кристални форми. Физико-химичните им свойства и установената биологична активност са основание за научни проучвания на новосинтезираните аналози за влияние върху свободно-радикални процеси.

Структура на дисертационни труд

Дисертационния труд е структуриран правилно и съгласно приетите изисквания. Написан е на 160 страници и съдържа следните раздели: Литературен обзор – 46 стр.; Материали и методи – 10 стр.; Резултати и обсъждане – 77 стр. и Списък на цитираната литература – 11 стр. (117 литературни източника). В литературния обзор са представени 8 схеми, които илюстрират насочено механизмите на оксидативен стрес, структурата на изследваните съединения и др. В раздел „Резултати” са представени 6 таблици, 34 фигури и 1 схема, което прави този раздел богат на резултати, много добре онагледен и статистически обработени са резултатите. Давам положителна оценка за структурирането на дисертационния труд.

Анализ на дисертационния труд

1. Анализ на литературния обзор

Използвани са 117 литературни източници като по-голямата част от тях са публикации след 2000 г. Водещо място в обзора е ролята на свободните радикали при физиологични и патологични процеси в организма, механизмите на действие на свободните радикали, които определят оксидативната им токсичност. Авторката подробно се е спряла върху ролята на метали с променлива валентност в механизмите на токсичност на свободните радикали като фокусира върху желязото. Свързано със свободно-радикалните процеси е и тази част на обзора, която разглежда свойства и изисквания към цитостатици с антиоксидантно и хелиращо действие. Авторката правилно разглежда възможностите на нанотехнологиите в действията на природните

полизахариди, съответно техните свойства и приложението им като съединения за бъдещо потискане на оксидативния стрес. Литературният обзор е написан логично свързано с темата на проучването. Фактите от различните източници са правилно дискутирани и включени в текста му. Авторката на обзора прави положителен анализ на съвременните тенденции в свободно-радикаловите процеси, включително в областта на нови лекарствени форми и тяхното изследване. Положителна е оценката ми за литературния обзор. Схемите допълват знанията по проблема. Така представения литературен обзор показва, че асистент Надя Христова-Авакумова познава отлично литературата върху проблемът на изследванията и е способен млад учен.

2. Цел и задачи

Целта е точно формулирана. Правилно са подбрани отделните задачи, които са свързани с целта на проучването. Имам бележка към този раздел. Във всички задачи се дискутира какво се очаква от изследванията, което разводнява точността на дадената задача. Например: в задача 1, в началото е ясна и точна формулировката, но след нея следва подробен текст, обясняващ какво авторката очаква от тази задача. Дори да включи подобни текстове, те трябва да бъдат ясни, без подробности, което според мен е правилно в научните изследвания.

3. Материали и методи

Структурните аналози са представени и дискутирани в своите химически разлики. Различни видове методи, включващи аналитични, биофизични и фотометрични с висока чувствителност са правилно подбрани за целта на проучването. Дисертантката подробно е описала методичната част, която е важна за получаване на научна степен „доктор”. Асистент Надя Христова-Авакумова има опит като експериментатор, умее да комбинира няколко техники при доказване на фармакологичните ефекти на новосинтезираните аналози на SBH. Осем нови аналози на SBH са изследвани за антиоксидантни свойства.

Бележка: дисертантката е използвала МТТ метод, който не го намирам отразен в автореферата в раздел „Материал и методи”.

4. Резултати и обсъждане

Експериментите са проведени съгласно поставената цел и задачи и са логично свързани. Структурата и състава на новосинтезираните съединения са определени чрез

съвременни аналитични и физични методи преди изследванията за антиоксидантни свойства. Доказано е, че 8-те аналози на SBH имат антиоксидантна активност. При структурно модифициране на съединенията се променя антиоксидантната им активност. При използването на различни методи за регистриране на ефектите на новосинтезираните аналози върху свободно-радикалните процеси се установяват резултати, даващи основание на дисертантката да обсъжда механизми за елиминиране на стабилните свободни радикали при отделните съединения. Известно е, че липидната пероксидация е точна характеристика за промени в клетъчните мембрани. Липидната пероксидация се свързва с механизми на оксидативен стрес и механизми на антиоксидантна клетъчна защита. Дисертантката използва модел на система с жълтъчен хомогенат и установява антиоксидантна активност на база модулиране на липидната пероксидация, както за изходното съединение, така и за останали аналози. Тя също прилага лецитин-съдържаща система, чрез която демонстрира концентрационни зависимости в ефектите на изследваните съединения и степента на оксидативно увреждане. Интересен резултат е, че бром-съдържащите аналози понижават по-слабо желязо-индуцираното оксидативно увреждане в сравнение с изходното съединение. Това изследване тя сравнява с резултатите, получени при структурна промяна в молекула на аналози, където се премества метокси група от 3-та на 4-та позиция и съединенията показват по-значима антиоксидантна активност. Тези сравнителни изследвания дават основание на дисертантката да дискутира оптимизиране на структурата на изходното съединение чрез включване на метокси група, което води до протекция на мембраната от токсичното действие на свободните радикали. Бром-съдържащите аналози показват също по-слаб протективен ефект към оксидативното увреждане в сравнение с изходното вещество при друг модел с дезоксирибоза. Изследвайки всички аналози на изходното съединение при желязо-зависимо оксидативно увреждане се получават резултати за антиоксидантна активност, която е близка до тази на изходното вещество. Дисертантката фокусира върху резултатите с оптимизиране структурата на SBH чрез включване на метокси група или бром в алдехидното ядро и увеличаване на антиоксидантната активност при опитите в жълтъчен хомогенат като допуска подобрение на мембранните компоненти при оксидативно увреждане. Протективният ефект на съединенията с включване на метокси група е засилен при модела на UV-оксидативно увреждане. Самостоятелен раздел в „Резултати“ е проучването на механизма на антиоксидантно действие, както на изходното вещество, така и на неговите аналози при взаимодействие с различни

активни форми на кислород. Дисертантката използва хемилуминисцентни методи и проучва веществата в динамика, като резултатите демонстрират зависимост на антиоксидантните свойства от вида на модификация на изходното вещество. Няма данни за хипотеза относно механизма на действието на изследваните хидразони в клетъчните процеси, които са свързани със свободните радикали.

В дисертацията са проучени сравнително и антиоксидантните свойства на аналози на изходното съединение при включване на пиридин в структурата или при преместване на метокси групата. Резултатите демонстрират по-слаби антиоксидантни свойства на тези аналози, които имат включен пиридин в сравнение с новосинтезираните вещества с метокси група. Посочените резултати отново подкрепят становището на дисертантката, че при заместване с метокси група в структурата на хидразоните се засилва ефекта на съединението върху свободно-радикалните процеси. Сравнителни проучвания показват, че най-силен ефект имат тези производни, при които метокси групата е на 3-та позиция. Три-метокси хидразоните притежават най-голям потенциал да инхибират свободно радикалните процеси още в началния етап на развитие на оксидативни промени и това се дължи на понижаване количеството на свободен кислород сочат резултати на дисертантката. Тези резултати с три-метокси хидразони откриват важно бъдещо направление за задълбочени *in vivo* изследвания за антиоксидантна активност. При проследяване на ефекта на новосинтезираните съединения в инхибиране на свободно-радикалните процеси се установява също, че халогенирането на изходните хидразони не променя значимо техните антиоксидантни свойства. И при тези експерименти се получават резултати, които подкрепят посочените по-горе, че съединенията с метокси група имат по-силен инхибиращ ефект върху свободните радикали. В дисертационния труд са представени резултати от изследвания с МТТ тест и от приложение на новосинтезираните вещества в система с пероксидаза от хрян-водороден пероксид. Не са убедителни резултатите с МТТ тест. Резултатите от изследване с втората система показват различия в ефектите на отделните аналози. На фигура IV.3.5 са представени резултатите от посочените експерименти. При хидразоните, които имат модификация на 3-та или 4-та позиция в алдехидното ядро е отчетено силно потискане на хемилуминисцентния отговор в системата (панел Б). При заместване с бромоводороден атом на 5-та позиция в алдехидното ядро на изходното съединение е отчетен по-малък отговор (в панел А). Дисертантката е представила отчетените резултати в трите панела, показващи статистическа обработка, но както в тази фигура, така и в други фигури не виждам представяне на статистическа

достоверност при сравнение между групите, което е моя бележка към фигурите в раздел „Резултати“. При посоченото проучване с най-значим ефект е пиридин-съдържащият триметок-систеруен аналог.

Анализът на този раздел ми дава основание да направя следните заключения:

1. Дисертантката е използвала съвременни методи, които е приложила правилно и е получила резултати, които са добре онагледени в дисертацията.
2. Проучени са 8 вещества, които са сравнени по между си при различни структурни промени и това е новост във фармакологията на антиоксиданти относно зависимостите между химическа структура и антиоксидантна активност.
3. Резултатите от изследванията са представени логично свързани и всички експерименти са добре планирани.
4. In vitro тест системите са правилно подбрани и това определя възможността на дисертантката да докаже молекулни механизми на антиоксидантна активност на използваните хидразони и техните производни.
5. Имам следните забележки към раздел „Резултати и обсъждане“: отнася се за всички фигури, на които не виждаме статистически сравнени отделните групи. Например: фигура IV.3.4 при хемилуминисцентните проучвания и регистриране на свободен O_2 са проведени в динамика изследвания при различни концентрации на KO_2 . Всяка група има статистическа обработка, но няма данни за статистически разлики между отделните групи в трите панела А, Б и В. В текста дисертантката правилно е посочила процентните промени, които са представени на фигурите, но липсват данни за разлики между активността на отделните съединения. Би било по-полезно, ако към обсъжданията в отделните раздели дисертантката включи повече доказателства от други изследвания на други автори. Това тя е направила успешно към обсъждането на резултатите от изследванията в раздела за взаимодействие с различни активни форми на кислород.

Обсъждането на резултатите е компетентно представено в дисертацията. Правилно е решението да има обсъждания след всеки подробен раздел на изследванията, което придава по-голяма яснота на получените резултати.

Изводи и приноси

Резултатите са представени в 5 основни изводи, като извод 1 и 2 имат по няколко допълнителни уточняващи изводи. Това е правилно, защото са изследвани много съединения, между които има различия в отделните резултати. Дисертантката представя 5 научно-приложни приноси и 1 методичен принос. Подкрепям изводите и приносите. Най-значимия принос според мен на научните изследвания в този дисертационен труд е прогрес в направление „Химическа структура и антиоксидантни свойства на фармакологични средства“. Посоченото определя значимостта на научните изследвания, които не са леки и изискват прецизност и продължителни експерименти. Към приносите допълвам ролята на полизахаридните частици в антиоксидантния потенциал, което дисертантката е посочила в 4-ти принос, но не така точно и ясно.

Публикационна дейност, свързана с дисертацията

Резултатите са обобщени в 4 статии, две от които са в списания с IF. С това се спазват изискванията.

Дисертантката е първи автор на публикуваните научни статии, което определя нейният личен принос и подчертана активност в публикационната дейност. Представени са и участия с доклади и постери в български и международни научни форуми (5). Положително е, че дисертантката е участвала в 3 финансирани конкурсни научни проекти.

Авторефератът отговаря на структурата на дисертацията и представя водещите резултати от проведените изследвания, информация за материал и методи, публикационна дейност и др. Нямам бележки върху автореферата.

Положително е становището ми относно публикационната дейност и десиминиране на резултатите от изследванията в дисертацията на различни научни форуми.

Нямам съвместни публикации с асистент Надя Георгиева Христова-Авакумова. Познавам я като колега от научни конгреси, на които тя убедително докладва свои резултати. Познавам я като уважаван асистент, както от студентите, така и от своите колеги.

Заклучение

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем в медико-биологичните науки. Проведени са задълбочени проучвания за влияние на ефектите на 8

новосинтезирани структурни аналози на салицилалдехидбензоилхидразон върху свободно-радикалови процеси. Приложени са съвременни и различни методи за доказване активността на тези вещества в *in vitro* системи. Резултатите внасят новости в съвременно направление при изучаване на оксидативен стрес и антиоксиданти, което е свързано със зависимост между химическа структура и антиоксидантна активност. Резултатите са оригинални, нови и дават възможност за бъдещи, както фундаментални, така и предклинични проучвания на някои от тези новосинтезирани аналози. Дисертацията напълно отговаря на изискванията на закона за развитие на академичния състав в Република България и на изискванията за неговото приложение в МУ – София.

Убедено препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да присъди на ас. Надя Георгиева Христова-Авакумова научната и образователна степен „доктор” по докторска програма „Биофизика”, в професионално направление 4.1. Физически науки от област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика.

15.08.2018 г.

София

Рецензент:


/Проф. д-р Надка Бояджиева, дмн/