

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Спаска Ангелова Станилова д.б.н.

Медицински Факултет на Тракийски Университет гр. Стара Загора

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

професионално направление 7.1. Медицина

докторска програма: *Медицинска Биология*

Автор: *Десислав Грозев Томов*

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: Медицинска Биология

Тема: **Определяне на оксидативен стрес чрез използване на течна хроматография с мас спектрометрична детекция**

Научен ръководител: проф.д-р Добрин Свиначков д.м.н.

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г.

Нямам забележки по представените документи.

### 2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантът: Десислав Грозев Томов е роден на 12.03.1975г. През 1999г завършва медицина в МУ- София като магистър-лекар. През 2012г. взема специалност по Клинична лаборатория в МУ-Пловдив и работи в Клинична лаборатория. От 2018 до 2020 провежда няколко специализации свързани с хроматографски анализ и HPLC; LC-MS валидиране на методи, едната от ПУ- Паисий Хилендарски, а другите две от тях в чуждестранни университети, а именно Университета в Тарту и Масачузетския технологичен институт на САЩ. Очевидно тези специализации определят и бъдещето развитие на докторанта в областта на хроматографския мас спектрометричен анализ. От 2015 работи в технологичен център по спешна медицина а от 2019 и понастоящем в Катедра Биоорганична химия на МУ Пловдив, където отговаря за извършването на хроматографския мас спектрометричен анализ и реализира експерименталната работа по дисертационния труд.

### **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Изследването е свързано с проучване на промените в оксидативния статус чрез количествено определяне на концентрациите на окислени метаболите в биологични течности посредством мас спектрометрия. Тагетният метаболит – 8-isoPGF2-alpha е определян количествено чрез валидиран метод включващ течна хроматография последвана от мас спектрометрия позволяваща точно определяне на ниски концентрации за диагностични цели. Изопростаните, както е и 8-isoPGF2-alpha са стабилни молекули, едни от крайните метаболите от неензимно окисление на естерите на арахидоновата киселина, участващи в състава на фосфолипидите в клетъчните мембрани като тяхната концентрация корелира с тази на реактивните кислородни продукти (ROS). Като един от продуктите на липидната пероксидация, който се намира във всички биологични течности, включително плазма, урина, ликвор и слюнка може да се използва за оценка на оксидативния стрес в организма.

Оксидативният стрес е състояние при което е нарушено равновесието между процесите на синтез и неутрализиране на свободните радикали, което е предпоставка за увреждане на клетъчните структури и тяхната функция и реализиране на паталогични промени на клетъчно и органно ниво. През последното десетилетие се натрупаха множество експериментални данни свързващи оксидативния стрес както с възникването, така и с прогресията на голям брой заболявания, включително онкологични и невродегенеративни. Изучаването на оксидативния стрес и търсенето на нови подходи към подсилване на собствените защитни антиоксидантни системи и/или потискане на свободнорадикаловата увреда в организма, включително използването на различни натурални екстракти и вещества с изявена антиоксидантна функция е нова и актуална сфера в биомедицинските и клинични изследвания. Многообразните механизми и роли, които играе оксидативният стрес в различни процеси в организма, изискват той да бъде измерен и оценен с подходящи методи.

В заключение предвид научните данни по темата и представеният литературен обзор проведените изследвания от докторанта са подчертано актуални, както в теоретично направление, така и за конкретно медицинско приложение в клиничната диагностика.

### **4. Познаване на проблема**

Литературният обзор е добре структуриран и систематизиран в съответствие с темата, което показва че дисертанта е запознат с постиженията на световната и наша наука по изследвания проблем, както и свързаните с изследването на проблема съвременни изследователски и диагностични методи. Цитирани са 158 литературни източника.

Представени са подробни данни за ендогенните и екзогенни фактори и механизми на генериране на свободни радикали в клетъчните компартаменти, химичните и биохимични им превръщания, както и стабилността на различните ROS. Представена е ролята на свободните радикали като част от физиологичните процеси в организма и участието им в регулацията на артериалното налягане, в секрецията и функцията на цитокини, растежни фактори и хормони, в невромодулацията. Разгледани са подробно и молекулните механизми на промените в биологичните макромолекули (липиди, протеини, нуклеинови киселини и въглехидрати) под въздействието на различните видове ROS, когато регулаторните механизми са неефективни и концентрацията им е повишена поради по-голям синтез и/или неефективни антиоксидантни процеси. Последващите нарушения в тяхната структура и функция, водеща до клетъчни, тъканни и органни нарушения медиращи патологичните промени в организма също е добре описана. Творчески са описани и анализирани разнообразните методи за оценка на оксидативния стрес, като се определят количествено различни крайни метаболити от ефекта на ROS и възможностите за техния анализ, в зависимост от периода им на полуживот. Реактивните кислородни и азотни видове включват както сравнително стабилни молекули като водороден пероксид и алкил хидропероксид, така и силно реактивните хидроксиден, супероксиден и алкоксиден радикал с кратък полуживот и неподходящи за изследване. Особено внимание е отделено на количествения анализ на изопростани в биологична матрица чрез течна хроматография с мас спектрометрична детекция. Подробно са описани различните подходи при йонизацията на анализираното вещество (аналита) и понастоящем използваните масови анализатори (квадруполни, магнитно секторни, TOF, QIT, орбитрап и тандем мас спектрометри), както и техните преимущества и недостатъци в зависимост от естеството на пробата в която ще се определя количествено анализата.

Така написаният литературен обзор показва че докторанта познава състоянието на проблема и творчески го интерпретира. Също така дава солидна база за планиране и провеждане на собствените проучвания на докторанта в очертаната тематика.

Целта на дисертационния труд е точно и ясно формулирана и научно обоснована и тя е да се разработят и валидират методи за анализ на 8-isoPGF2-alpha в различни биологични матрици чрез течна хроматография с тандем мас спектрометрия и да се апробира приложението им за диагностика и клинични проучвания. Поставените задачи, четири на брой произтичат от целта на дисертацията и са реализирани изцяло в експерименталната част.

## **5. Методика на изследването**

Основната методика на изследването е високо ефективна течна хроматография последвана от детекция с мас спектрометрия. Мас спектрометричния анализ широко се използва за детекция на атомни и молекулни йони според тяхното съотношение маса/заряд ( $m/z$ ). При детекцията пробата може да бъде директно анализирана, но с цел повишаване на специфичността и чувствителността по-често първоначално преминава разделяне чрез течна или газова хроматография, след което се йонизира и подава към мас детектора. Понастоящем едни от най-широко разпространените тандем-мас анализатори са тройно-квадруполните, при които има комбинация от три последователно разположени квадрупола, като първият и третият са масови филтри, а вторият е колизионна клетка. Този метод на детекция е използван и в настоящия дисертационен труд, като разделянето на компонентите от изходната проба е извършено в аналитична колона с твърд пълнеж. Чрез така описания метод е реализирано количественото определяне на 8-isoPGF2-alpha в кръвна плазма и слюнка, след подходяща обработка за преципитиране на протеините в пробата и изолиране на анализа.

Избраната методика на изследване позволява постигането на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

Представеният аналитичен метод в раздел Материали и методи е оригинална разработка на докторанта, включваща модификация на предварително разработен метод за пробоподготовка с помощта на течна-течна екстракция с разделяне на фазите, хроматографско разделяне с core-shell (пълнеж тип „твърда сърцевина“) аналитична колона и мас спектрометрична детекция.

## **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

В раздела Резултати и дискусия са подробно описани получените от експериментите данни, след статическа обработка, което позволява да се направят сравнения и подходящи изводи в съответствие с поставената цел и задачи докторанта. Обема и представените графики и таблици (26 таблици и 31 фигури) са подходящи за илюстриране на резултатите от експериментална дейност. В първата глава са представени експериментите относно разработването и верифицирането на течна хроматографски метод с мас спектрометрично количествено определяне на 8-isoPGF2-alpha в кръвна плазма. Принципно анализът на вещества с ниски концентрации като 8-isoPGF2-alpha в сложна матрица, каквато е кръвната плазма е голямо предизвикателство и изисква подходяща пробоподготовка. Докторанта

сравнява четири екстракционни процедури на пробоподготовка за да определи метода с най-висок добив на анализираното съединение. Оптимизирано е и хроматографското разделяне чрез сравняване на няколко аналитични колони чрез инжектиране на стандартен разтвор на 8-isoPGF2alpha с определени концентрации и определане на най-добро съотношение S/N за пика на търсения аналит и вътрешния стандарт. Оптимизирането на мас детектора включва подбор на подходящи условия за йонизация на аналита чрез настройка на температурата на изпаряване (Vaporiser temperature), приложеното напрежение на спрея (Spray Voltage), налягането на газовите потоци (Sheath Gas, Aux Gas, Ion Sweep Gas) и температурата на трансферната капиляра (Capillary temperature). Представена е пълната характеристика на валидирания метод като долна граница на количествено определяне на 8-isoPGF2alpha за най-ниска точка от калибрационната крива (5 ng/L); откриваемост при ниско ниво (91.3 %) и при високото ниво (96.0 %); точност и възпроизводимост, селективност и стабилност.

Във втората глава е описана аналогична процедура, която е приложена за апробиране и валидиране на течно-хроматографския метод с мас спектрометрична детекция за анализ на изопропан 8-isoPGF2- $\alpha$  в слюнка.

В третата глава са представени резултатите от количественото определяне на 8-isoPGF2- $\alpha$  чрез описания по-горе валидиран метод в плазма на 21 здрави доброволци и 95 пациенти с автоимунен Тиреоидит на Хашимото с цел оценка на оксидативния стрес. Получените в това изследване по-високи средни стойности на 8-isoPGF2-alpha в групата с тиреоидит на Хашимото в сравнение с контролната група ( $8.8 \pm 7.8$  срещу  $5.9 \pm 3.4$ ,  $p=0.043$ ), потвърждава предходни публикувани резултати относно значението на 8-isoPGF2alpha като биомаркер за свободнорадикалова увреда при това заболяване. Получените резултати не показват значими разлики в зависимост от нивата на тироидни хормони и стадия на заболяването, вероятно поради малкия брой пациенти, но не са в полза на разработената методика. За да се установи значението на количественото определяне на 8-isoPGF2- $\alpha$  като преимуществен показател докторанта би трябвало да направи сравнение със друг краен метаболит от липидната пероксидация, например малондиалдехид. Освен това докторанта използва понятието оксидативен стрес при пациентите само на базата на един показател, концентрацията на 8-isoPGF2- $\alpha$  макар че сам описва оксидативния стрес като нарушен баланс между продукцията на свободни радикали и тяхното неутрализиране.

В последната четвърта глава са представени и обсъдени резултатите от количественото определяне на 8-isoPGF2- $\alpha$  чрез описания по-горе валидиран метод в слюнка на

стоматологични пациенти преди и в динамика на 2 и 7 час след поставяне на металокерамичната конструкция. Резултатите от анализа на проби стимулирана слюнка показват чувствително по-ниски нива на 8-isoPGF2-alpha, които проявяват тенденция за покачване на втория час и на седмия ден след поставяне на металокерамичната конструкция.

При сравнение на резултатите за 8-isoPGF2-alpha в стимулирана и нестимулирана слюнка на 35 стоматологични пациента се установява, че преди започване на протетичното лечение нивата в нестимулираната слюнка са много по-високи от тези в стимулираната ( $p=0.001$ ). На втория час след поставяне на металокерамичната конструкция също се установява статистически значима разлика в нивата ( $p=0.008$ ), като в нестимулирана слюнка те отново са по-високи. На седмия ден не се установяват статистически значими разлики в концентрациите на 8-isoPGF2-alpha в двата типа слюнка ( $p=0.491$ ). Извършеният анализ показва наличие на силна положителна корелация между нивата на 8-isoPGF2-alpha и тези на изследваните метални йони в нестимулирана слюнка преди началото на лечението

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Изопростаните са стабилни крайни продукти от липидната пероксидация на арахидонова киселина и са изомери на ензимно получени продукти като простагландини и левкотриени. Семейството на F2-изопростаните се състои от 64 различни изомери като най-широко измерваният е 8-изо простагландин F2-алфа (8-isoPGF2-a). Златен стандарт за измерване на 8-iso PGF2a се счита газова хроматография – масспектрометрия (GC/MS) обаче методите на твърдофазната екстракция, необходими за подготовка на пробите, са трудоемки и често водят до замърсяване, генериране на артефакти и води по-скоро до смес от четири изомера, които се измерват отколкото само на 8-iso PGF2-a. Количествено 8-iso PGF2a може да бъде измерен и чрез ELISA, като обикновено дава по-високи резултати от GC-MS, което може да се дължи на кръстосана реактивност на поликлоналните антитела с други метаболити на изопростана. Анализът може да се извърши и с помощта на течна хроматография съчетана с масспектрометрия, която позволява по-специфично измерване на 8-isoPGF2-a. Именно този подход е използван при разработване на оригиналната процедура описана в настоящия дисертационен труд и включваща подходяща пробоподготовка, течнхроматографско колонно фракциониране и мас-спектрометрична квадриполна детекция позволяващ по-висока специфичност и чувствителност на количественото определяне на 8-isoPGF2-a. Освен това методиката е подходящо адаптирана за определяне на 8-isoPGF2-a в кръвна

плазма и слюнка с цел диагностичното и приложение за количествена детекция на един от основните маркери за оксидативни увреждания при различни заболявания.

В обобщение приемам извода на докторанта, че методът за анализ на 8-isoPGF2-alpha в кръвна плазма съчетава оригинална пробоподготовка с фазова сепарация, оптимални хроматографски и мас спектрометрични параметри, отличава се с широк концентрационен обхват, много добра аналитична надеждност и отговаря на всички изисквания за изследователско и клинично приложение. Този извод очертава и основния научно-приложен принос на дисертацията за внедряване на нов метод за доказване наличието на повишена продукция на ROS в условията на развитие на патологичен процес.

Проведените изследвания с този метод позволяват да се направи и друг оригинален научен извод за положителна корелация между повишената продукция на ROS в устната кухина и локалните възпалителни процеси, както и да се оцени ефекта на проведеното лечение. В частност е установена и положителна връзка между локални оксидативни увреждания и приложението на CoCr сплави в устната кухина.

В заключение представената Дисертация има актуален и приносен характер, както в разработването на оригинална методика за количествено определяне на 8-isoPGF2-alpha чрез високоскоростна течна хроматография с мас детекция, така и за оценка на повишена продукция на ROS при пациенти. Така разработената методика има висок потенциал за внедряване в диагностичната практика.

## **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Във връзка с дисертационният труд са представени 3 реферирани публикации, като две от тях са в списание с IF=2.157 и Q3 по SJR, а една в списание с Q2 с което се надхвърлят изискванията на МУ-Пловдив, формулирани в Правилника за получаване на научно-образователната степен „Доктор”. И трите публикации са свързани с темата на дисертацията и отразяват основни резултати получени в процеса на научно-експерименталните изследвания. В публикацията за разработка на методиката докторанта е на първо място, а в останалите две на второ, което илюстрира неговият принос за проведените изследвания. Две от публикациите вече са цитирани, като по данни от Scopus имат три цитата. Освен това докторанта е докладвал резултати в 5 научни форуми, три от които в чужбина.

## 9. Лично участие на докторанта(ката)

От представените материали – дисертация и публикации, свързани с нея е видно личното участие на докторанта в проведеното изследване, получаване и обработка на резултатите както и формулираните изводи. Докторанта е участвал и в два научни проекта на МУ-Пловдив.

## 10. Автореферат

Представеният от докторанта автореферат отразява адекватно съществената част от дисертационният труд. Авторефератът съдържа основната част от резултатите и тяхното обсъждане, както и всички задължителни данни относно докторанта, научното жури и защитата.

## 11. Критични забележки и препоръки

Определяне на изопростани и в частност-iso PGF2a в биологични проби най-често се използва за регистриране на свободно радикаловите увреждания и се извършва чрез три основни подхода – газоха хроматография с мас детекция, течна хроматография с мас детекция и имунологични (ELISA и RIA) методи. Всеки от тези подходи има свои преимущества и недостатъци. Би било добре ако докторанта бе провел сравнителен анализ на пробите освен със новоразработената методика и с друг метод, например ELISA като по-лесно достъпен, за да се сравнят резултатите и установят разликите. Разбира се това може да се приеме и като препоръка за бъдещо изследване от докторанта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ-Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на МУ – Пловдив. Дисертационният труд показва, че докторантът Десислав Грозев Томов **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност



Медицинска Биология като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на Десислав Грозев Томов в докторска програма по Медицинска Биология

23. 08. 2023 г.

Рецензент:

Проф. Спаска Станилова, д.б.н.

