



РЕЦЕНЗИЯ

2

от акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн

на дисертационния труд на доц. д-р Живко Желязков Желев „Нитроксидните радикали като контрастни субстанции за диагностика на патологии, свързани с нарушения в проницаемостта на кръвоносните съдове и клетъчния редокс-статус“, представен за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

1. Кратки биографични данни

Доц. Живко Желязков Желев е роден на 23.07.1962 в гр. Стара Загора. Възпитаник е на Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, който завършва през 1988 г. с магистърска степен по „Биохимия“. Като докторант на самостоятелна подготовка в катедра „Медицинска химия и биохимия“ при Медицинския факултет на Тракийския университет, Стара Загора, през 2010 г. защитава дисертация за ОНС „Доктор“ по „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“, изработена под научното ръководство на проф. дхн Веселина Гаджева.

След дипломирането си д-р Желев е бил на работа в Института по физиология при БАН (1988–1991 г.); Националния институт за авангардни индустритални технологии, Япония (2002–2007 г.); Центъра за молекулен имиджинг при Национален институт за радиологични изследвания, Япония (2007–2012 г.); Токийския университет, Япония (2011–2012 г.) и (понастоящем) Катедра „Медицинска химия и биохимия“ при Медицинския факултет на ТУ-Стара Загора. На тези места той е заемал длъжности от изследовател, в началото на кариерата си, до ст. изследовател и доцент.

Доц. Ж. Желев е автор на 100 научни статии, от които 65 са в списания с ИФ. Общий ИФ на неговите трудове е над 400, индивидуалният – 101, а H-факторът му е 20. В 1/3 от публикациите, които са цитирани досега повече от 1700 пъти, той е първи автор. Съавтор е на 10 японски патента, в половината от които е водещ автор. Д-р Желев е участвал в разработването на 12 изследователски проекти, на 4 от които е ръководител. Той е научен ръководител и на двама успешно защитили докторанти както и научен консултант на дипломанти, докторанти и специализанти по „Биоорганична химия“ и „Фармация“ в Япония.

2. Общ преглед на документацията и дисертационния труд

Комплектът документи представен от доц. Ж. Желев на хартиен и електронен носител е изгответен педантично съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и Правилника за неговото приложение.

Дисертационният труд обхваща 265 стандартни страници, 103 цветни фигури, 14 таблици, множество химически формули и уравнения, и 528 литературни източници. Във връзка с дисертацията са публикувани 25 научни труда, от които 18 в списания с ИФ (общ ИФ 63.280). В 14 от трудовете докторантът е водещ автор. Броят на забелязаните цитати свързани с тези трудове е 133.

3. Актуалност на дисертационната тема

Дисертационният труд на доц. Желев е посветен на приложението на нитроксидните радикали като контрастни субстанции за образна диагностика на патологии свързани с редокс-статуса на клетки и органи с цел откриване на нарушения в проницаемостта на кръвоносните съдове.

Нитроксидните радикали са едни от най-изучаваните стабилни свободни радикали, за които по данни на Google съответстват 345 000 позовавания, а на Google

Scholar - 24 800 статии. Българските учени също имат голяма заслуга в изследването на нитроксидните съединения. Можем да се гордеем, че в страната ни отдавна съществува научна (старозагорска) школа посветена на този проблем. Тя е създадена от покойния проф. Захари Райков и е наследена от неговата ученичка проф. Веселина Гаджева. Доц. Ж. Желев е продължител на това дело, но за разлика от своите предшественици, чиито усилия бяха насочени главно съм синтез и изучаване свойствата на новополучените съединения, той търси приложението им за *in situ* визуализация на редокс процесите в живи клетки и тъкани. При зададен ключов текст „*Nitroxide radicals as spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging*“ Google Scholar открива 323 публикации. Това показва, че избраното научно направление е ново и перспективно. Можем да очакваме, че скоро ЕПР метода базиран на стабилните нитроксидни радикали ще се нареди заедно с останалите методи и технически средства за образна диагностика в услуга на бъдещата медицина. С други думи, актуалността на разработваната темата е извън всякакво съмнение.

4. Оценка на дисертационния труд

Дисертациата на доц. Желев е структурирана в класически стил и е написан на ясен и точен научен език.

Литературният обзор, представен на около 50 страници, включва четири тематични раздела посветени съответно на: а) Нитроксидните радикали като контрастни субстанции за магнитно-резонансна образна диагностика (обща характеристика, химична структура, спектрални характеристики, парамагнитни свойства и техники за детекция, магнитно-резонансни техники за диагностика и др.); б) Фармакокинетика и метаболизъм на нитроксидите и динамика на EPR/MRI контраста в организма; в) Нитроксидите като контрастни субстанции за редокс-имиджинг при индуциран оксидативен стрес (редокс-имиджинг на мозък, тумори и други биологични обекти с използване на уловители на свободни радикали); г) Преглед на други контрастни субстанции използвани за определяне на редокс-статуса на биологични обекти.

След задълбочен анализ на обемистата литература, докторантът прави следните важни изводи, които предопределят насоките на по-нататъшната му изследователска дейност, а именно: а) EPR и MRI са достигнали нивото на мощен инструмент за изследване на ROS и редокс-статуса на биологични обекти *in vivo*; б) Надеждният редокс-имиджинг изиска нови технически средства с висока разрешителна способност и нови контрастни субстанции характеризирани с по-висок контраст, по-висока устойчивост към редуктори, повишена чувствителност към оксидативен стрес и улеснено проникване през клетъчната мембра и КМБ; в) Кинетиката на EPR/MRI сигнала *in vivo* зависи от множество фактори, от които по-важните са време на живот на спин-сондата в кръвния ток, проникването й през клетъчните мембрани, метаболизирането в черния дроб, екскрецията през бъбреците и др.

Като следствие от направените изводи, докторантът извежда *Целите и задачите* на своята дисертация, а именно, да изследва връзката между физико-химичните свойства на нитроксидните радикали и възможностите за тяхното използване като контрастни субстанции за MR диагностика на патология, свързани с нарушена проницаемост на кръвоносните съдове или с редокс-дисбаланс водещ до развитие на оксидативен стрес, както и да изясни ролята на някои ендогенни окислители и редуктори в динамиката на нитроксид-усилените EPR и MRI сигнали. Във връзка с поставените цели са формулирани седем основни задачи.

Основният раздел на дисертацията е *Резултати и дискусия*. В съответствие с поставените задачи, експерименталните резултати са представени и дискутиирани също в седем подраздела, а именно: Връзка между физикохимичните свойства на

7 нитроксидните радикали и използването им като спин-маркери за EPRS и MRI визуализация на проникването на лекарствени средства през клетъчната мембрана и кръвно-мозъчната бариера; използване на нитроксидни радикали като контрастни вещества за визуализиране и анализ на промени в проницаемостта на кръвоносните съдове и КМБ при хиперхолестеролемия с използване на MRI; визуализация на бъбречна дисфункция при хиперхолестеролемия; визуализация на тъканния редокс-статус при експериментални тумори и на митохондриална дисфункция при свръхпродукция на супероксид в допаминергичната област на мозъка при мишки с паркинсонизъм, както и на клетъчния редокс-статус на клетъчни линии при индуциран оксидативен стрес с използване на MRI и EPRS. Всеки подраздел завършва с кратко заключение.

Амбициозната изследователска програма е реализирана с помощта на адекватни клетъчни и животински модели (ракови и неракови клетъчни линии; мишки с експериментална хиперхолестеролемия и паркинсонизъм; миши тумори), както и с разнообразна методология и високо чувствителна експериментална техника. Използваните методи биват: *физикохимични* (електрохимичен анализ на окислителния потенциал на нитроксиди радикали), *спектроскопски* (EPR в разтвор, както и на клетъчни суспензии, тъканни хомогенати, изолирани клетки и тъкани; MRI на клетъчни суспензии и експериментални животни), *биохимични* (определяне на общ холестерол, HDL-холестерол и матриксни металопротеинази в кръвна плазма; определяне на общия антиоксидантен потенциал и на активни кислородни форми в биологични преби), *цитологични* (DHA, DCF и MTT/MTS тестове; оцветяване с трипаново синьо; диференциален анализ на левкоцити) а също *хистологични* и *статистически* методи. EPR и MRI измерванията *in vitro* и *in vivo* са провеждани с нова генерация спектрофотометри (X-band EPR Spectrometer JEOL, Japan и 7.0 T MRI с хоризонтален магнит, Kobelco & Jastec, Japan), с които разполагат партньорските японски лаборатории. Методите са описани подробно, което позволява експериментите да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература, а това прави дисертацията на доц. Желев ценно методично пособие за бъдещи докторанти и специализанти в тази област.

Както вече беше отбелязано, експериментите свързани с дисертацията са проведени акуратно, с използване на всички необходими контроли и избягване на артефакти. Резултатите са онагледени педантично и са интерпретирани задълбочено в светлината на литературните данни, което позволява да се извлече максимална полза от тях, а приносите да се очертаят още по-добре.

Изследвайки факторите влияещи върху MRI сигнала и качеството на регистрираните образи, доц. Желев намира, че супероксидът повишава, а водородният пероксид понижава T1 MRI контраста на водата. Той показва също, че супероксидът не променя интензитета на EPR сигнала на парамагнитните форми на нитроксидите, но повишава интензитета на EPR сигнала на диамагнитните форми. За разлика от него, H_2O_2 не повлиява интензитета на сигнала и на двете форми.

В своите изследвания върху спин-маркерите като средство за визуализация на проникването на лекарствени средства през клетъчната мембрана и кръвно-мозъчната бариера д-р Желев използва нитрозурейния нитроксиден радикал TEMPO. Той доказва, че радикалът е стабилен във физиологични течности, а преминаването му през клетъчната мембрана и КМБ, както и динамиката на EPR/MRI сигнала в кръвния ток и тъканите зависят от неговата хидрофобност. Като правило, проникването на нитроксидните радикали в клетъките и тъканите нараства с повишаване на хидрофобността (което е очаквано), а времето им на полуживот намалява.

Друг нитроксид – СМРх, който има хидрофилен характер лък е определен като подходящ за откриване на малки промени в проницаемостта на КМБ и ефекта на

антилипидемични лекарствени средства чрез MRI. Използвайки мишки с хиперхолестерolemия, той доказва два ендогенни фактора (MMP-9 и възпалителен процес), които са отговорни за повишаване проницаемостта на кръвоносните съдове за СМРх, респективно за динамиката на MRI контраста в тъканите. Същият нитроксид е подходящ и за MRI диагностика на бъбречна дисфункция.

Други две нитроксидни съединения - SLENU (хидрофобен) и TEMPOL (амифилен), са охарактеризирани като подходящи маркери за MRI визуализация на тумори базирана на разликите в редокс-статуса на туморната и нормалните тъкани. С тяхна помощ д-р Желев показва, че тъканите на животните с тумори имат повишен оксидативен капацитет, а тези на здравите животни - висок редуциращ потенциал. Той установява, че тъканният редокс-статус се променя в хода на туморната прогресия, което от своя страна разкрива възможност самото изменение в редокс-статуса да бъде използвано като индикатор за туморогенезата и развитието на туморите.

Тъй като митохондриите са основния генератор на водороден пероксид и свободно-радикалови кислородни съединения в клетката, нитроксидните радикалови съединения са подходящи маркери и за изследване на митохондриална дисфункция чрез MRI. За целта доц. Желев използва две нитроксидни съединения - Mito-TEMPO и methoxy-TEMPO. От тях първото е използвано за изследване на митохондриалната дисфункция при експериментални мишки с паркинсонизъм, за които е типична свръхпродукцията на супероксид и повишен оксидативен стрес в допаминергичната област на мозъка. При тези мишки д-р Желев показва наличието на понижен редуциращ и висок оксидативен потенциал на мозъчните тъкани, което е потвърдено и чрез два други конвенционални хистологични теста. Двата нитроксида са подходящи контрастни субстанции и за визуализиране на клетки с различна пролиферативна активност съпроводена с разлики в техния редокс-статус.

5. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приносите свързани с дисертационния труд на доц. Ж. Желев могат да се подразделят в две групи – *научни и приложни*, макар че между тях не съществува рязка граница. Научните приноси са свързани с изучаването на свойствата на нитроксидните във физиологични течности, проникването им през клетъчни мембрани и КМБ, динамика на натрупване и освобождаване от клетки и тъкани, фактори влияещи върху EPR и MRI сигналите и др. Мярка за високото качество на получените резултати и техният приносен характер е качеството на списанията в които са публикувани и отзивите за тях (цитатите) в световната литература.

Към приложните приноси отнасям резултатите, които полагат нови основи или надграждат вече положени основи на методи за образна диагностика базирана на редокс-статуса на клетки, тъкани и органи и на нитроксид-усилените EPR и MRI сигнали. Така той за първи път осъществява маркиране на лекарствени средства с нитроксиди с цел неинвазивното им визуализиране при проникване в клетките и преминаването им през КМБ; разработва нов метод за *in vivo* визуализиране на малки промени в проницаемостта на КМБ и периферните кръвоносни съдове, както и нов метод за *in vivo* визуализиране на бъбречна дисфункция базиран на СМРх и нитроксид-усилен MRI; разработва нов методичен подход за визуализиране на тумори *in vivo* на базата на тъканния редокс-статус, нитроксидни радикали и MRI спектрометрия; създава нов метод за *in vivo* визуализиране на митохондриална дисфункция в мозъчни тъкани базиран на нитроксидния радикал *mito-TEMPO* (редокс-сензор) и нитроксид-усилен MRI, както и нови методични подходи за изследване на клетъчния редокс-статус и индукцията на оксидативен стрес *vitro*.

6. Автореферат

Запознат съм с автореферата и намирам, че той отразява напълно и адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

7. Критични бележки

Във връзка с рецензирания дисертационен труд нямам забележки по същество. Със задоволство установявам, че всички забележки и препоръки, които бяха отправени към докторанта по време на аprobацията са взети предвид и отбелязаните тогава слабости са отстранени в крайната версия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Дисертационния труд на доц. Живко Желев е обемисто научно изследване с пионерен характер за въвеждането и утвърждаването на методи за образна диагностика базирана на нитроксид-усилените EPR и MRI сигнали с цел визуализация на редокс-статуса на клетки, тъкани и органи *in vivo*. Изследванията са проведени с помощта на модерна методология и съвременен лабораторен инструментариум. В резултат на това са получени огромни по обем резултати с подчертан приносен характер за науката и практиката. Научните резултати са публикувани в едни от най-добрите реферирани списания в областта на химията, медицината и медико-биологията, а за приложните са издадени 10 японски патента. Със своята ерудиция и научни постижения доц. Желев се представя като водещ български изследовател, високо ценен иуважаван от световната научна общност, който напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и вътрешния Правилник на МФ при ТУ-Ст. Загора за придобиване на научната степен „**Доктор на науките**“ по научната специалност „*Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества*“, което ми дава основание убедено да препоръчвам на уважаемото Научно жури да му я присъди.

12.06.2017 г.

Рецензент:



/Акад. Иван П. Иванов/