



## СТАНОВИЩЕ

от чл.-кор. дбн Андон Радев Коцев, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН

за дисертационния труд на тема: „*Нитроксидните радикали като контрастни субстанции за диагностика на патологии, свързани с нарушения в проницаемостта на кръвносните съдове и клетъчния редокс-статус*“, представен от доц. д-р **Живко Желязков Желев** за присъждане на научната степен „доктор на науките“ в научното направление 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества)

Темата на дисертацията и проведените изследвания са **изключително актуални**, насочени към разработването на методи за визуализиране на малки промени в проницаемостта на кръвно-мозъчната бариера, както и за визуализиране и анализ на тъканния редокс-статус „ин виво“ и клетъчния редокс-статус „ин витро“ при различни експериментални модели на патологии, съпроводени с развитие на окислителен стрес. Методите се базират на използването на подходящи редокс-сензори – нитроксидни производни, и високочувствителни техники като електрон-парамагнитен резонанс (EPR) и магнитно-резонансна томография (MRI). Актуалността на изследванията следва и от направения литературен обзор – цитирани са 528 източници, като почти  $\frac{1}{4}$  от тях са публикувани през последните 5 години (след 2011 година).

Дисертационният труд е написан на 265 страници и е отлично илюстриран (103 фигури, 14 таблици). Състои се от следните раздели: Въведение, Обзор на литературата, Цели и задачи, Материали и методи, Експериментални резултати и дискусия, Изводи, Приноси, Литература. Експерименталните резултати и дискусията към тях заемат 1/2 от обема на дисертацията (137 стр.). Приложен е оригинален подход при описание на резултатите. Всеки раздел (общо 7 раздела) започва с кратко въведение към проблема и обосновка на конкретната цел, следва изложението на експерименталните резултати и тяхната дискусия, с кратко заключение в края. Този, бих казал монографичен стил улеснява читателя при възприемането и осмислянето на големия обем резултати.

Авторът на дисертацията е използвал широк набор от методи, които са описани в детайли. Експериментите се базират на 5 експериментални модела на животни, няколко експериментални модела на култивирани клетки и няколко безклетъчни химични системи. Използвани са различни спин-сонди – хидрофилни, амфи菲尔ни и/или хидрофобни, проникващи или непроникващи в клетките и през КМБ, в зависимост от

целите на всеки раздел. Към интерпретацията на резултатите авторът е подходил много сериозно и задълбочено, като се е постарал да отчете всички предимства и недостатъци на използваните спин-сонди и методи за тяхната детекция в живи биологични обекти, както и структурните фактори в организма, които могат да повлият динамиката на контрастните свойства на нитроксидните радикали.

Получените резултати дават основание да се формулират много приноси с оригинален характер, от които най-важните са:

- (1) За първи път е докладвано маркиране на лекарствени средства с нитроксиден радикал за неинвазивно визуализиране на проникването им през КМБ и локализиране в мозъчните тъкани, чрез използване на нитроксид-усилен MRI на интактни животни. Това изследване е получило широк отзук в пресата, вкл. в средствата за масова информация в Япония, САЩ и Европа.
- (2) Разработен е нов методичен подход за *in vivo* визуализиране на малки промени в проницаемостта на КМБ и периферните кръвоносни съдове и анализ на ефекта на антилипидемични лекарствени средства върху този процес при мишки с хиперхолестерolemия, чрез използване на нитроксида CMPx като контраст и MRI.
- (3) Разработен е нов методичен подход за *in vivo* визуализиране на бъбречна дисфункция и анализ на ефекта на антилипидемични лекарствени средства върху функцията на бъбреците при мишки с хиперхолестерolemия, чрез използване на нитроксида CMPx като контраст и MRI. За първи път резултати от нитроксид-усилен MRI на бъбреци са верифицирани с конвенционална контрастна субстанция – Gd-DTPA, която доказва затруднена бъбречна филтрация при хиперхолестерolemия.
- (4) Разработен е нов методичен подход за визуализиране на тумори *in vivo* на базата на тъканния редокс-статус, чрез използване на MRI и серия от нитроксидни радикали (SLENU, SLCNUgly, TEMPOL), проникващи в клетките на съответната тъкан. За първи път е направена съпоставка между динамиката на нитроксид-усиления MRI сигнал в тъканите на здрави животни и животни-тумороносители. Подходът се базира на редокс-цикъла на нитроксидите и динамиката на контрастните им свойства в организма, като отчита всички структурни и функционални фактори. Методът е приложим и на изолирани тъканни препарати и кръвни проби. Това изследване също е получило широк отзук в средствата за масова информация в Япония.
- (5) Формулирани са основните структурни фактори, отговорни за динамиката на нитроксид-усиления MRI сигнал в организма и приложимостта на нитроксидите като редокс-сензори за анализ на тъканния редокс-статус *in vivo*.
- (6) Разработен е нов методичен подход за *in vivo* визуализиране на митохондриална дисфункция в мозъка на мишки с паркинсонизъм, на базата на свръхпродукцията на супероксид в допаминергичната област, чрез използване на нитроксидния радикал mito-TEMPO като редокс-сензор и нитроксид-усилен MRI. Методът е приложим и за неинвазивен анализ на оксидативен стрес и редокс-дисбаланс в мозъка при други невродегенеративни заболявания.
- (7) Разработени са нови методични подходи за MRI и EPR анализ на клетъчния редокс-статус и индукцията на оксидативен стрес в изолирани клетъчни линии *in vitro*, чрез използване на нитроксидни радикали (mito-TEMPO и methoxy-TEMPO) като редокс-сензори. Методите са подходящи за: (а) отдиференциране на неракови от ракови

- клетки, на базата на различния им редокс-статус; (б) анализ на степента на оксидативен стрес, индуциран *in vitro* в неракови клетки чрез системата 2-ME/Rot; анализът се базира на свръхпродукцията на супероксид и промяна в клетъчния редокс-статус.
- (8) Получено е пряко доказателство на моделни безклетъчни системи, че супероксидният радикал повишава, а водородният пероксид понижава T<sub>1</sub> MRI контраста на водата – в отствие и присъствие на нитроксид.

Материалите включени в дисертационния труд са публикувани в 25 статии (18 с импакт фактор и 7 без импакт фактор), в 14 от които доц. Желев е първи автор. Резултатите са представени и на 13 научни форума. Общий импакт-фактор на публикуваните статии от 2009 г. до момента е 63.28 – достатъчно висок за дисертация за присъждане на научната степен „доктор на науките“. Голяма част от статиите са в много авторитетни (високоимпактни) списания, като: *Chemical Communications (Cambridge)*, *Molecular Pharmaceutics*, *Clinical Cancer Research*, *ACS Chemical Neuroscience*, *Molecular BioSystems*, *European Journal of Cancer* и др. Открити са 133 цитата (като са цитирани 14 статии) и 15 отзива – висока цитируемост на работите, като се има предвид, че всички публикации по темата на дисертацията са от 2009-та година до момента.

**В заключение, теоретичните и експерименталните разработки по дисертацията са много логично планирани, реализирани и задълбочено описани и анализирани в представените ми за становище материали.** Извършена е голяма по обем експериментална работа. Получени са съществени резултати, които се характеризират с висока степен на оригиналност и приложна насоченост. Публикационната активност надхвърля значително препоръчителните критерии на Правилника за развитие на академичния състав в Тракийския университет, а и не само в него. Всичко това ми дава основание да препоръчам на уважаемите членове на Журито да присъди на доц. д-р Живко Желязков Желев научната степен „доктор на науките“ в научното направление 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества)

12 юни, 2017 г.

  
/чл.-кор. дбн Андон Р. Косев/