

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на тема: „Разработване на методология за изследване на метаболитните промени в черния дроб на хипотиреоидни организми”, представен от инж. биотехнолог Климент Иванов Занов за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**” по научната специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологичноактивните вещества” от доц. д-р инж. Данчо Любенов Даналев, катедра „Биотехнология”, Химикотехнологичен и металургичен университет - София

Представената ми за рецензия дисертация е написана на 106 стандартни страници. Тя е добре структурирана със съответни раздели: Въведение - 3стр., Литературен обзор - 18, Цел и задачи - 1, Материали и Методи - 18, Резултати и дискусия - 33, Изводи – 3 и Приноси и бъдещи насоки за работа – 1 стр. Цитираната литература обхваща 171 източника, като около половината от тях са след 2000 година. Още тук ще си позволя да отбележа, че цитирането на научната литература е доста разхвърляно, като липсват години на издаване на няколко публикации (9, 104, 106, 107, 113 и 129), имената на авторите са цитирани по различен начин, като дори е използвано съкращение et al. (91 литература) с един цитиран автор, при литература 114 липсват страници, а томовете са цитирани по най-разнообразен начин, което прави впечатление при иначе изключително добре оформения дисертационен труд, а и би затруднило едно бъдещо използване на тази литература, каквато в крайна сметка е целта на написването и доброто оформяне един дисертационен труд.

Трудът е насочен към разработване на **нова** методология за изследване на метаболитни промени в черен дроб на хипотиреоидни организми чрез използване на LC-MS и изцяло отговаря на научната специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”.

Съвременните методи за анализ и разделяне на биомолекули в това число хормони, антибиотици, пестициди, протеини и др. се развиват с бурни темпове още от средата на миналия век. Силният напредък в електронното инженерство и технологии, както и откриването на нови начини за минитюаризацията и навлизане на технологиите наноатомно ниво, даде възможност за откриване на нови насоки за конструирането на

по-мощни и чувствителни детектори, позволяващи определяне на фемо- и атограми от вещества. Всичко това създаде предпоставки за връщане към някои недоизяснени в миналото феномени, свързани с ролята на определени биомолекули в метаболизма на клетките и до създаване на нови направления за анализ, които силно подпомогнаха медицинската диагностика като все по-модерната през последните няколко години област метаболомика, върху която е концентрирано вниманието на настоящия дисертационен труд. В този глобален контекст направлението избрано от дисертанта и неговите научни ръководители е изключително модерно и актуално. Освен това всеизвестен е факта, че анализът на биомолекули в биологични течности е добре опозната макар и все още експлоатирана територия, но анализа на тези вещества в тъкани е не добре изучено направление и едно голямо предизвикателство за редица научни групи, за което свидетелства големия брой съвременни публикации цитирани и в настоящата дисертация.

Разделът **Литературен обзор** е написан на изключително добър научен език и в него ясно личи аналитичния подход на докторана. Конкретно са описани структурата, биосинтеза, метаболизма и физиологичната активност на хормоните на щитовидната жлеза, обект на дисертационния труд. В допълнение място е отделено на аналитичните подходи и техники за анализ на хормони на щитовидната жлеза описани в научната литература и по-специално имунологичните анализи, хроматографските методи и спектралните техники. Най-задълбочено тук е разгледана течната хроматография с мас-детекция като мощна техника за анализ на биомолекули и метаболити и в контекста на приложението ѝ за изработването на настоящия дисертационен труд.

Към тази част от дисертацията имам следните забележки и въпроси:

1. Не става ясно дали публикуваната на фиг. 1, стр. 12 блок схема е направена от автора на база негови знания и расъждения или е литературна. Ако е литературна под фигурата липсва цитат от къде е взета тя.
2. Във връзка с изречението на стр. 21 „В тази сфера се използват най-чувствителните детекторни системи, тъй като се цели определяне на максимален брой аналити, повечето от които са в ниски концентрации, поради опростената пробоподготовка” бих искал докторанта да дискутира какво според него се включва в една пробоподготовка, за да бъде тя определена като опростена или усложнена. Не е ли една от основните цели на пробоподготовката именно концентрирането на даден компонент в анализираната смес. Концентрацията която се получава зависи именно от избора на метод за екстракция и нейния краен успех по време на пробоподготовката, а иначе

възможностите на съвременните детектори са несъмнено големи в концентрационно отношение.

Целта на дисертацията, а от там и поставените задачи са формулирани ясно, реалистично и конкретно.

В раздела «Материали и методи» подробно са описани всички използвани реактиви и приложени техники за отглеждане и умъртвяване на тестовите животни (тук задължително трябва да се отбележи, че са спазени всички изисквания съгласно международната директива 86/609/ЕЕС), за пробоподготовка на чернодробна тъкан за целите на ВЕТХ-МС анализа, изборът между вътрешен и външен стандарт и подхода за валидиране на метода. След това в раздела докторанта изключително задълбочено и с голямо разбиране е разяснил принципа на действие на ВЕТХ с МС детекция, използваща детектор тип «йонен капан». Сравнително са разгледани две основни техники за йонизация, а именно химичната йонизация при атмосферно налягане (APCI) и електроспрейонизация (ESI), като е мотивирано решението за използване на ESI в конкретния случай по работата на дисертанта, като са посочени основните предимства на тази техника пред останалите. Накрая на този раздел значително място е отделено на статистическите методи за обработка на резултатите, техните теоретични принципи и причината за техния избор за обработка на конкретните данни по настоящия дисертационен труд. Към този раздел имам кратка бележка, че по мое мнение всички теоретични постулати и разсъждения относно избора на системи за екстракция, разделяне и статистическа обработка би трябвало да бъдат обект на съответните места в раздела «Резултати и дискусия», тъй като те са обект на интелектуален труд на дисертанта, а в раздела «Материали и методи» да се посочат само конкретните данни за използваните методи. Разбира се тази моя бележка в никакъв случай не намалява стойността на раздела или дисертацията като цяло и аз оценявам високо новаторския подход на автора на дисертационния труд инж. Занов.

В основния раздел от дисертационния труд «Резултати и дискусия» докторантът е отразил и успял аналитично и критично да изложи извършения от него огромен експериментален труд. Прави много добро впечатление обобщението на многобройните данни, прецизно отразени във фигури и таблици. Интерпретацията на резултатите е направена на високо научно ниво и от съвременна гледна точка в съгласие с новостите в биоаналитичната химия. Към този раздел имам следните бележки и въпроси:

1. На стр. 58 е спомената хептафлуормаслена киселина, но наименованието ѝ по системата на IUPAC е хептафлуор**обутанова** киселина.

2. Интерес буди на стр. 58 използването на 32 минутен линеен градиент. Бих искал докторанта да дискутира кое е наложило такова нестандартно време на градиента?

3. Дали в литературата има данни за промените, които настъпват с изследваните хормони и метаболити при **хипер**тироидни мишки, за да се направи някакво сравнение относно получените резултати.

Считам, че работата по настоящия дисертационен труд е довела до следните позначими приноси :

1. Разработена е методология за екстракция на хормони на щитовидната жлеза от черен дроб. Според авторите методологията е приложима и при екстракция на други тъкани.

2. Разработен е бърз хроматографски метод за количествено определяне на хормони на щитовидната киселина, аминокиселини и други нискомолекулни метаболити. Методът успешно може да бъде прилаган за изследователски цели и клинични анализи на тъканни проби. Предимствата му пред съществуващите до момента методологии са, че при един анализ се получава информация за много аналити.

3. Идентифицирани са 22 основно хидрофилни метаболити.

4. Методологията е приложена в практиката за метаболитен анализ на мозъчна кора.

5. Установено е, че при хипотиреоидизма се засяга цикъла на трикарбоксиловите киселини в черни дроб.

6. Изказани са хипотези за промените настъпващи при синтеза на аминозахари и мастни киселини при хипотироидизъм.

7. Направена е хипотеза за нарушенията в белтъчния синтез поради намаленото количество левцин и аспарагинова киселина, което създава предпоставки за по-нататъшен белтъчен анализ.

Направените забележки и отправените въпроси за изясняване, същността на работата и постигнатите от докторанта резултати, в никаква степен не намаляват общото впечатление за прецизно и добросъвестна извършена и интерпретирана експериментална работа, което е доказателство за отличните теоретични познания на дисертанта по научната специалност към която е претенцията за докторката степен,

както и в близки и свързани научни области. Дисертационния труд несъмнено съдържа голям брой научни и научно-приложни резултати, които са изключително оригинални. Доказателство за това са участията в голям брой научни форуми у нас и в чужбина (общо 5) и оформянето на дисертацията в 1 научна работа в списание с импакт фактор и две работи подадени за печат.

Автрефератът напълно отразява постигнатото от докторанта и е изцяло съобразен с изискванията на чл. 11, ал. 5 от Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на ХТМУ .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имайки предвид, че „доктор” е образователна и научна степен, инж Климент Занов е усвоил най-съвременните техники за анализ, разделяне и детекция прилагани в лабораторната практика за определяне на всякакъв вид биомолекули. Дисертационният труд е изработен съвместно между ХТМУ-София и Университета в Патра-Гърция, което е доказателство за умението на дисертанта за работа в екип, интеграция в интердисциплинарна и международна среда, които качества са от съществено значение за реализацията на трудовия пазар днес. Всички тези факти са довели до оформянето на дисертация с високо фундаментално и научно-приложно ниво, което убедено считам, че ще доведе до успешното реализиране на докторанта.

Във връзка с всичко изложено до тук убедено ще подкрепя присъждането на образователната и научна степен „доктор” на инж. Климент Иванов Занов.

25.09.2012



РЕЦЕНЗЕНТ:

/доц. д-р Д. Даналев/

