

РЕЦЕНЗИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично-активни вещества”, шифър 01.05.10. Тема на дисертационния труд: **”Разработване на методология за изследване на метаболитните промени в черния дроб на хипотиреоидни организми“**

Автор на дисертационния труд: *инж. Климент Иванов Занов*

Рецензент: *Иванка Борисова Стойнева, доцент, д-р,* Институт по Органична химия с Център по фитохимия – БАН,

Дисертационният труд на редовен докторант *инж. Климент Иванов Занов* е разработен в катедра Биотехнология “ на Факултет по химично и системно инженерство при ХТМУ София под ръководството на проф Любов Йотова-ХТМУ и проф.Мария Клапа-FORTH Патра, Гърция. Дисертацията съдържа 106 печатни страници, 27 фигури, 10 таблици и 171 цитирани литературни източника. Много добро впечатление прави литературния обзор написан на 19 стр. с подробна информация за биосинтеза на хормоните на щитовидната жлеза и използваните аналитични подходи и техники за тяхното определяне. Написан е ясно и логично и личи, че дисертантът владее много добре литературата по материята на бъдещите изследвания. Целите и конкретните задачи за изпълнение в дисертацията са формулирани ясно. Експерименталната част, резултатите и дискусията са написани информативно и компетентно.

АКТУАЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Дисертацията на *инж. Климент Занов* е едно съвременно и комплексно изследване в областта на биоанализната химия, като инструмент на метаболомиката - наука която идентифицира и количествено определя метаболитите в биологични системи в бозайници,

животни, растения и микроби. Известно е, че нарушения във функцията на щитовидната жлеза водят до хормонално заболяване -хипотиреоидизмът, пряко свързано с метаболитни промени в различни органи, при което се засягат отделителна, опорно-двигателната и нервната система. Метаболомиката като научно направление има потенциал за изясняване на механизмите на хипотиреоидизма и изграждане на хипотези, които да доведат до по-ефективна диагностика и лечение на това заболяване. Особено актуални и значими са изследванията в тази дисертация поради факта, че досега няма разработена методика за определяне на хормони на щитовидната жлеза, техни метаболити и други нискомолекулни компоненти в тъкани от бозайници.

МЕТОДИ И ПОДХОДИ

При изработването на този дисертационен труд дисертантът инж. Климент Занов е използван широк спектър от изследователски подходи - експериментални и статистически методи.

Разработената е методика за хомогенизация и екстракция на метаболити от тъкани на черен дроб от мишки

С цел определяне на аминокиселини, които също са обект на анализа е извършена модифицирана на методиката за екстракция с въвеждане на **вторична двуфазна течна екстракция** .

За анализиране на целевите хормони, метаболити и други нискомолекулни компоненти в тъкани от бозайници са **оптимизирани аналитичните параметри при хроматографско разделяне с маспектрометрична детекция с масанализатор от типа „йонен капан”** .

Анализът и обработването на данните от маспектралните изследвания е извършено със софтуерен пакет Xcalibur 1.3 LC Devices, Thermo Electron, САЩ.

За статистическа обработка на метаболитните профили са използвани алгоритми от софтуерния пакет TM4 MeV (v4.0).

ДОСТОВЕРНОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В дисертационния труд са получени и се дискутират главно резултати свързани с:

Оптимизиране на пробоподготовката

Базирайки се на известните методики за пробоподготовка при анализ на хормони съдържащи се в биологични течности е разработена методика за пробоподготовка на подходящи проби от тъкани на бозайници. . При хомогенизацията и екстракцията са изпробвани различни екстракционни подходи като най-добри резултати са получени при екстракция с метанол и модификация на рН с използване на 0.02N амониев хидроксид.

Оптимизиране на параметрите при използваните аналитични техники

Разработена е и е оптимизирана процедура за обратно-фазово хроматографско разделяне на набор от метаболити екстрахирани от чернодробната тъкан на контролни и хипотиреоидни Balb/cJ мъжки мишки.

Изпробвани са различни техники за йонизация на хроматографския поток като електроспрей (ESI) или химическа йонизация при атмосферно налягане (APCI), като е избрана електроспрей йонизация, чиито работни параметри са оптимизирани с максимална ефективност на йонизацията и изпаряване на молекулите на елуентите.

Подбрани и са валидирани два вътрешни стандарти- теофилин и норлевцин за количествено определяне на максимален брой аналитил

Чрез статистически методи са определени значимите пикове от получените резултати (10 положителни и 4 отрицателни).

ОСНОВНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ

Дисертационният труд има следните научни приноси:

- Разработена е оригинална методика за хомогенизация, денатурация и екстракция на биологична тъкан от бозйници като е варирано рН на средата, количество и вид на разтворителя
- За пръв път е разработена методика за екстракция на хормони на щитовидната жлеза тироксин -Т4 и 3,3',5 три йод тиронин - Т3от тъкан на черен дроб., която е приложима и при екстракция на други тъкани.
- Разработен бърз хроматографски метод с висока чувствителност (пикомолни количества) за количествено определяне на хормони на щитовидната киселина, аминокиселини и други нискомолекулни метаболити. Методът може да бъде прилаган за изследователски цели и клинични анализи на тъканни проби. Поради високата чувствителност на метод при един анализ може да се получи информация за много анализи.
- Регистрирани са 34 аналитични сигнала и са идентифицирани 22 метаболити, повечето от които хидрофилни.
- Методиката успешно е приложена за метаболитен анализ на мозъчна кора.
- Установено е, че при хипотиреоидизма се засяга цикъла на трикарбоновите киселини в черни дроб. Изказани е хипотеза за промените в синтеза на аминоксахари и мастни киселини, която ще бъде изследвани в бъдеще.

Направените научни изводи отразяват коректно получените резултати за не описани досега в литературата данни при анализ на хормони и метаболити в черния дроб.

Основните приноси в дисертацията на инж. Климент Зановимат оригинално научно и приложно значение и могат да бъдат определени като обогатяване с нови данни на съществуващите знания в метаболомиката.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ

Повечето от направените критични бележки при предварителното обсъждане на дисертационния труд са взети под внимание, но има и някои пропуски.

Фиг. 2 на стр. 13 , както и някои други фигури са с лошо качество, въпреки добрата компютърна подготовка на докторанта. На стр. 54 се забелязва некоректен израз като „всички молекули демонстрират добра разтворимост...”, на стр. 58 „да компрометират разреждането” или „експериментални реплики”

На стр.60 надписът под фиг. 17 за наложените хроматограми не е верен, в Т3 има примес от Т4, а не обратното както е показано.

Прекалено често и не винаги на подходящо място се ползва изразът „широкообхватен” не много точно преведен от английски.

Срещат се и изрази като кондициониране на колоната, вместо уравновесяване ,или бозайническа тъкан, вместо тъкан от бозайници и др.

Липсва списък на публикациите в дисертацията, а в автореферата е предстен по начин не отговарящ на никакви стандарти.

Направените критични бележки не понижават стойността на получените много добри резултати при изработването на тази дисертация, а имат за цел да помогнат на дисертанта да прецизира изказа и изложението на научен материал в бъдеще.

.

ЛИЧЕН ПРИНОС НА ДИСЕРТАНТА

Не буди никакво съмнение, че цялата експерименталната работа, както и статистическата обработка на резултатите в дисертацията са лично дело на дисертанта, извършено под компетентното ръководство на неговите научени ръководители.

Личният принос на дисертанта е неоспорим от съавторите и при подреждането на авторите в публикациите по дисертацията. Резултатите представени в дисертацията са публикувани в 1 излязла от печат работа в списание с импакт фактор и 2 публикации изпратени за печат в престижни хроматографски списания.

Авторефератът е изготвени съгласно изискванията и отразява основните научни резултати, описани в дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационната работа на инж. Климент Занов е едно съвременно и комплексно изследване в интердисциплинарната област - метоболомика. Кандидатът за получаване на образователната и научна степен “Доктор” се е запознал и е овладял много нови експериментални аналитични техники. От представеният експериментален материал и от получените резултати, се вижда, че дисертантът е придобил и много нови познания и умело интерпретира сложните резултати. По време на изработването на дисертацията дисертантът е проявил качества като трудолюбие, прецизност и критичност. Той е един мотивиран, знаещ и можещ млад учен. Поради това убедено препоръчвам на членовете на научното жури да гласуват за присъждането на редовен докторант инж.Климент Занов образователната и научна степен “Доктор”.

23.10 2012



/доцент д-р Ив.Стойнева/