

РЕЦЕНЗИЯ

от **Член кор. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

на дисертационния труд на гл. ас. инж. **Михаил Неделчев Камбуров** на тема **„Пречистване на аprotинин с помощта на афинитетни сорбенти на основата на хитозан и трипсин“**, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор“** по научната специалност **5.11. „Биотехнологии“** (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества)

1. Обща част

Със заповед на Ректора на ХТМУ-София № АД-20-461/21.11.2012 г. съм определен за член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационния труд на гл. ас. инж. **Михаил Камбуров** на тема: **„Пречистване на аprotинин с помощта на афинитетни сорбенти на основата на хитозан и трипсин“**, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор“** по научната специалност **5.11. „Биотехнологии“** (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

Представеният от инж. Камбуров комплект материали включва следните документи:

- Молба до Ректора на ХТМУ за разкриване на процедурата за защита
- Автобиография
- Копие от диплома за завършено висше образование (ОКС „магистър“)
- Заповед за зачисляване в докторантура
- Протокол за положени изпити/кандидатски минимуми по специалността
- Заповед за отчисляване с право на защита
- Протокол от катедрения съвет свързан с апробацията на дисертационния труд
- Дисертационен труд
- Автореферат
- Копия на научните публикации свързани с дисертационния труд

2. Кратки биографични данни за докторанта

Михаил Камбуров е възпитаник е на ВХТИ-София (понастоящем ХТМУ-София). Завършва *„Технология на пластмасите“* в тогавашния Факултет по органична технология, след което постъпва на работа във ВХТИ като научен сътрудник (II и I ст.), а впоследствие спечелва конкурс за Ст. асистент (1989 г.) и Гл. асистент (1999 г.) към катедра „Биотехнология“. През 1987 г. е зачислен в докторантура с научен ръководител проф. М. Кръстева, а след изтичане на срока на докторантурата, е отчислен с право на защита. Поради смяна на тематиката, понастоящем се явява на защита без научен ръководител.

3. Актуалност на тематиката

Дисертационният труд на Михаил Камбуров е посветен на протеазния/трипсинов инхибитор аprotинин, който отдавна е намерил приложение в медицината за лечение на заболявания свързани с повишена протеолитична активност в определени органи и системи (панкреас, бял дроб и др.) при човека. Този факт, както и обстоятелството, че неговите изследвания са довели до създаването на патентно чиста и внедрена национална технология за производство на аprotинин, не поставя никакво съмнение за актуалността на разработваната от него дисертационна тема.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща 50 (от общо 137) страници и включва 150 литературни източници, повечето от които са публикувани през последното десетилетие. Той се състои от 3 подраздела: *Природни инхибитори на протеолитични ензими*, *Пречистване на белтъчни препарати* и *Имобилизация на ензими*.

Първият подраздел представлява преглед на структурата и свойствата на протеазните инхибитори и в частност на трипсиновия протеазен инхибитор (апротинин), а другите два са методични. От многобройните методи за пречистване на белтъци, тук са разгледани главно тези, които могат да намерят промишлено приложение (йонобменна, гелна и афинитетна хроматография). Третият подраздел (*Имобилизирани ензими*) също е развит в контекста на приложението на имобилизираните ензими за препаративни цели и в частност, използването им като афинитетни сорбенти. Задълбочено са представени и критично анализирани литературните данни свързани с носителите и методите за имобилизация, свойствата на имобилизираните ензими в сравнение с тези в разтвор, приложението им в практиката и др. Специално внимание е отделено на хитозана като матрикс за имобилизация на ензими, тъй като той е предпочетен носител в проведените във връзка с дисертацията експерименти.

Направената подробна литературна справка и критичният анализ на цитираната литература, е позволило на докторанта да намери своята изследователска ниша и да формулира точно и ясно целите и задачите на своята дисертация.

6. Целесъобразност на поставените цели и задачи

Целта на дисертацията е *да се получат афинитетни сорбенти на основата на хитозан и трипсин за получаване на апротинин за клинични цели*. В светлината на представените литературни данни, намирам така формулираната цел за целесъобразна. Адекватни на нея са и поставените 6 задачи, отнасящи се до методични изследвания свързани с оптимизиране на условията за омрежаване, дериватизацията и гранулирането на хитозана, както и за имобилизация на трипсина. Крайната цел е да се разработи технология за получаване на апротинин, отговарящ на фармакопейните изисквания за клинично приложение.

5. Методика на изследването

Методичният раздел обхваща 16 страници от дисертацията и включва пълно описание на използваните материали и методи, което позволява възпроизвеждане на експериментите без необходимост от допълнителна методична литература. Този раздел, макар и не особено обемист, би могъл да послужи като методично ръководство за студентите-биотехнологи, разработващи своите дипломни работи в областта на приложната ензимология. Тук са описани методите за: изследване и определяне на молекулните характеристики на хитозана; омрежаване на хитозан; получаване на хитозанови микро и макро частици; имобилизация на трипсин; екстракция и хроматографско пречистване на апротинин от бял дроб; електрофореза на белтъци; изследване на микрогранули чрез сканираща електронна микроскопия и др. От този раздел се вижда, че докторантът прилага с лекота широка гама от биохимични, аналитични и физикохимични методи, както и модерна и сложна научна апаратура, което е една от основните цели на докторантурата в съответното професионално направление.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Резултатите от проведените изследвания са представени в раздел „Резултати“, който обхваща 55 страници. Те са илюстрирани с 11 таблици, 14 схеми и 48 фигури. Както вече беше отбелязано, М. Камбуров си поставя за цел да разработи афинитетно-хроматографски метод за пречистване на апротинин от говежди бял дроб. За целта той аргументирано се насочва към хитозана като носител за свързване на трипсин и с така пригонения афинитетен матрикс да пречисти апротинин до фармакопейна чистота. Разработването на технологията изисква да се оптимизират условията за следните по-важни стъпки от процедурата: а) подбор на хитозан с подходяща молекулна маса и степен на деацетилиране; б) омрежаване и дериватизация на хитозана с глутаров алдехид; в) получаване на хитозанови микрочастици; г) купелуване/свързване на трипсин към хитозановите частици; д) приготвяне на грубо пречистен апротинин; е) афинитетно пречистване на апротинин до фармакопейна чистота. Оптимизирането

на тези етапи изисква строг качествен и количествен контрол и, естествено, множество лабораторни експерименти.

Изследванията на Камбуров започват с два търговски препарати хитозан с различен произход – скариди и морски раци, които са подложени на анализ за определяне на молекулна маса и степента на ацетиране. Първият от тях е охарактеризиран като нискомолекулен (L, с молекулна маса 160 000 g/L), а втория – високомолекулен (H, с мол. Маса 400 000 g/L). Прилагайки три различни методи за анализ, той намира различни стойности за степента на деацетиране, но възприема усреднената стойност от 65%, която е подходяща за омрежаване с глутаров алдехид. И двата препарата (но в различни изходни концентрации) са използвани за приготвяне на хитозанови частици по два различни метода – утаечен и емулсионен. Първият води до получаването на частици с размер около 3 мm (които докторантът нарича макрочастици), а вторият – до среден размер 0.52 мm (микрочастици). Морфологията и порьозността на хитозановите частици е изследвана и добре документирана чрез сканираща електронна микроскопия.

Значителен дял от изследвания на Камбуров заемат експериментите свързани с уточняване на условията за омрежаване и дериватизация на хитозановите гранули, които са проведени главно с микрогранулирания (по емулсионен способ) лек (Ch-L) хитозан. Омрежаването е оценявано чрез IR спектроскопия по отнемването на максимумите при характеристичните честоти 1643 cm^{-1} и 1659 cm^{-1} . Варирайки съотношението на хитозан към глутаров алдехид е установено, че оптималното съотношение за омрежаване и модификация, определящи качествата на дериватизирания микрогранули, е 1:10. Именно такива микрогранули са използвани за имобилизация на трипсин, чийто капацитет достига до 180 mg/g трипсин. Иммобилизацията също е изследвана с помощта на IR спектрометрия и са изказани хипотези за химическите механизми на хитозановата дериватизация и за имобилизацията на трипсина върху дериватизирания микрогранули. Така, след задълбочени изследвания и анализи, докторантът създава възпроизводима лабораторна технология за получаване на матрикс (дериватизиран хитозан + ковалентно свързан трипсин) за афинитетно пречистване на аprotенин.

Условията за пречистване на аprotенина чрез афинитетна хроматография са разработени с не по-малка педантичност от тези за приготвяне на самия матрикс. Тук са изследвани почти всички параметри, които биха могли да повлияят на хроматографския процес, включително и двата варианта за афинитетно пречистване – в колона и в суспензия („batch”). Безспорно предимство има колонното пречистване.

Инж. Камбуров сравнява ефективността на разработения от него нов метод за афинитетно пречистване на аprotенин с класическия хроматографски метод, състоящ се в комбинация от анионообменна, катионообменна и гел-филтрираща хроматография, за който той има издаден национален патент. Сравнена е чистотата на получените препарати с тази на медицинския аprotенин произвеждан от световно известната фармацевтична фирма „Novo”. Сравнителният анализ не показва разлика в качествените хапактеристики на получения продукт, но разкрива технологични достойнства на предлагания нов метод.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Дисертационният труд на гл. ас. М. Камбуров има безспорен принос в развитието на методологията за пречистване на аprotенин. Той има издаден национален патент за „Метод за получаване на аprotенин”, който е внедрен в бившия „Фармахим”. По този метод е произвеждан лекарствения продукт „Апротил L” (лиофилна ампулна форма), преминал всички предклинични и клинични изпитания и регистриран за клинична употреба у нас.

8. Публикации по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са представени **4 научни труда** и **1 патент**. От публикациите 1 е публикувана в *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (с ИФ 0.700) и 3 са доклади в пълен текст отпечатани в списанието на УХТ-Пловдив „Хранителна наука”. С тази

продукция Камбуров удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и вътрешния правилник на ХТМУ за ОНС „Доктор”.

9. Лично участие на докторанта в изследванията

В 3 от публикациите, както и в патента издаден през 1995 г., М. Камбуров е първи автор, което е безспорен атестат за водещата му роля при осъществяване на свързаните с дисертацията изследвания.

10. Автореферат

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Дисертационният труд е написан с вещина на точен и ясен научен език и с минимална употреба на чуждици. Към докторанта нямам въпроси по същество.

12. Лични впечатления

Познавам гл. ас. М. Камбуров от около 20 години и съм убеден в неговите професионалните качества и уменията, както и в неговата честност като човек и изследовател.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на гл. ас. инж. Михаил Камбуров е пример за прецизна научна разработка с подчертан приложен характер. При нейната реализация той е вложил знания и методични умения от различни сфери на фундаменталните природни науки – биохимия, органична химия, аналитична химия, физикохимия и др., и е използвал своите инженерно-технологични умения за оптимизация на биотехнологичните процеси. Изследванията са проведени със съвременна методология и модерна експериментална техника и са довели до резултати публикувани в 4 статии и 1 патент. Чрез своите научни постижения той се представя като зрял изследовател и преподавател, който удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на ХТМУ-София за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”. Въз основа на всичко това, убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури *да присъди на Михаил Камбуров образователната и научна степен „Доктор”* в професионално направление *Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества)*.

12.12.2012 г.

Рецензент:

/Член кор. Проф. Дбн Иван Г. Иванов/