

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на тема: „Дизайн на оптичен биосензор за откриване на токсични съединения и фармацевтични продукти”, представен от Ахмед Хассан Анвар Хассан за присъждане на образователната и научна степет „доктор” по научната специалност 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологичноактивните вещества)

от доц. д-р инж. Данчо Любенов Даналев, катедра „Биотехнология”,
Химикотехнологичен и металургичен университет - София

По т. 1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

От представеното CV на кандидата за присъждане на ОНС „доктор“ става ясно, че той е роден през 1987 г. и е завършил своята бакалавърска степен по биотехнологии по двустранна програма между Университета в Кайро, Египет и Georgia State University, USA. Няколко години по-късно завършва магистърска степен по нанотехнологии в Университета на Кайро, Египет. Между двете степени докторантът е имал тримесечна специализация в университета Ludwig Maximilian Universitat на Мюнхен, Германия. През ноември 2013 г. е зачислен като редовен докторант по проект Erasmus Mundus MEDASTAR, към катедра „Биотехнология“ на ХТМУ под ръководството на проф. д-р инж. Любов Йотова.

Както самият докторант е дефинирал своите научни интереси те са насочени към получаването на наночастици и нанокompозитни материали и тяхното охарактеризиране с различни техники; разработване на оптични бионаносензори; геномика и протеомика; ферментационни биотехнологии; изолиране и пречистване на микроорганизми. В контекста на неговите интереси е и избраната от него тематика за разработване на дисертационен труд под ръководството на проф. д-р инж. Любов Йотова в катедра „Биотехнология“ на ХТМУ.

По т.2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Босензорите представляват аналитични устройства, които са намерили широко приложение в практиката за детекция на токсични замърсители в различни матрици, както и в диагностиката, за детекция на различни фармацевтични продукти и биоактивни компоненти. Тяхната лесна преносимост, сравнително лесният начин на

употреба и бързият отговор при детекция на целевите аналити са ги превърнали в част от съвременните техники за детекция и анализ на биомолекули. В този глобален контекст направлението избрано от дисертанта и неговият научен ръководител е изключително модерно, актуално и тясно свързано с практиката и нейните нужди от нови бързи и надеждни техники за анализ и детекция на аналити в различни матрици.

Представената ми за рецензия дисертация е написана на 126 стандартни страници. Нейната структура обхваща разделите: Въведение - 4стр., Литературен обзор – 28 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и Методи – 14 стр., Резултати – 31 стр., Дискусия – 16стр, Заключение – 2 стр. и Използвана литература – 11 стр. Цитираната литература обхваща 189 източника, като почти изцяло те са след 2000 година, което несъмнено е доказателство за актуалността на разработваната тематика. Още тук ще си позволя да отбележа, че цитирането на научната литература е изключително нееднородно, което създава впечатление за бързото ѝ нахвърляне в дисертационният труд. В едни случаи годината на издаване е в началото след авторите, в други в края на цитираната литература, едни статии имат заглавия, а други само автори и списание и т.н.

Трудът е насочен към разработване на оптичен биосензор за детекция на токсични замързители и фармацевтични продукти и изцяло отговаря на научното направление претендирано от докторанта „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”.

Литературният обзор на дисертацията последователно разглежда основните принципи и съставни звена на един класически биосензор, специфичните условия на които той трябва да отговаря, предимствата и недостатъците на биосензорите като алтернативна техника за анализ и тяхната класификация. По нататък докторантът се спира на различни носители използвани като матрици за имобилизация на основният компонент на биосензора, а именно ензимната молекула и на ензимът пероксидаза от хрян. Последните два компонента от биосензора обаче са някак приложени към литературният обзор и по-специално към раздела с видовете биосензори, а не са ясно обособени и глобално разгледани в контекста им на структурни звена на един биосензор. Например считам, че описанието на дендримерите като възможни матрици за имобилизиране на ензимният компонент на биосензора е било удачно да бъдат включени в подточката, описваща останалите матрици за имобилизация и самият процес на получаване на хибридни материали чрез съвременна зол-гел техника. Към тази част от дисертацията имам следните забележки и въпроси:

1. Не приемам първото изречение от раздела Въведение в което се казва, че ензимите са природни биокатализатори в нанометровата скала, тъй като е добре известно, че някои ензими катализират реакции дори в пико и фемомоларен диапазон при различни процеси в организма (например ацетилхолинестеразата в реакцията на предаване на нервния импулс, където ацетилхолинът е в концентрация около 10^{-12} M).
2. На стр. 14 в раздела Въведение докторантът представя реакцията на окисление на изходен субстрат под действие на пероксидаза до краен продукт (схема 1). Реакцията е показана схематично и не става ясно какво точно се случва със съединенията в нея и кое е съединението, което подлежи на детекция в края на процеса. Ако изходният и крайният продукт са с еднаква брутна формула както е показано на схемата, тогава как се случва, че присъстващият в лявата страна на уравнението фенол изчезва от реакцията. По мое мнение тук се образува хинон-иминна хромофорна система с участие на 4-AAP и фенол (V. Vojinovi, A.M. Azevedo, V.C.B. Martins, J.M.S. Cabral, T.D. Gibson, L.P. Fonseca, Assay of H₂O₂ by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterisation and optimisation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28 (2004) 129–135), която подлежи на следваща детекция. Бих обърнал внимание, че докторантът кандидатства за докторска степен в областта на Химическите науки, което предполага познаване на химичните структури на субстратите и продуктите на изследваните от него ензимни реакции.
3. В абстракта на своята дисертация, докторантът отбелязва, че е създаден нов ултрачувствителен биосензор (стр. 5). Кое определя новоконструираният биосензор като ултрачувствителен и в какво се състои разликата с високочувствителните или наночувствителните биосензори, ако такива съществуват, тъй като използването на понятието ултра- предполага покриването на определени параметри.
4. Считам, че в литературният обзор е можело да бъдат разгледани няколко примера за получаване на матрици за биосензори на основата и на други елементи като титан, ванадий, цирконий и т.н., а не само в рамките на 2 страници тези на основата на силиций, още повече че в тази научна група са разработени голям брой матрици, съдържащи титан като неорганичен компонент и докторантът е имал достъп до тези знания от своя научен ръководител. Също така намирам разглеждането само на ензима пероксидаза в рамките на 3 страници като алтернатива за конструиране на биосензор за недостатъчно при условие, че в литературата са известни голям брой биосензори на основата и на други ензими, а докторантът претендира представеното в главата Литературен обзор, за литературен преглед по тематиката.

Целта на дисертацията е поставена логично от направеният литературен обзор. Но и тук не става ясно, колко биосензора са конструирани и колко ензима са били използвани за конструирането им, тъй като в целта те са дадени в множествено число (page 46, construction of **biosensors**, based on covalent immobilization of **enzymes** onto), а по-нататък в задачите се говори само за пероксидаза от хрян и един биосензор, за детекция на различни окисляващи се субстрати?

В раздела «Материали и методи» подробно са описани всички използвани реактиви и приложени техники за синтез на необходимите за имобилизация на целевият ензим матрици, охарактеризиране на получените матрици, имобилизация на ензима пероксидаза върху матриците и определяне на активността на ензима преди и след неговото имобилизиране.

Основния раздел от дисертационния труд «Резултати и дискусия» е разделен отделно на резултати и дискусия. В глава 3 **Резултати** докторантът е отразил извършения от него експериментален труд. Прави добро впечатление, че той е усвоил нови съвременни техники за охарактеризиране на получените от него матрици. Получените резултати са представени чрез фигури и са обобщени в таблици, което несъмнено спомага за по-лесното им проследяване. Направена е оптимизация на условията за получаване на целевите матрици за имобилизация на ензима пероксидаза, при конструирането на целевия биосензор. Ензимът е охарактеризиран по отношение на неговите каталитични свойства след имобилизиране върху различните матрици. Полученият нов биосензор е тестван по отношение на три субстрата, а именно фенол, резорцинол и парацетамол. Към този раздел имам следните бележки и въпроси:

1. На стр. 55 схемата на действие на пероксидаза отново е дадена като са упоменати съединение 1, 2 и т.н., което отново оставя впечатлението, че докторантът не е наясно какво точно се случва в тази реакция. До какво се разпада на първият етап от реакцията вложеният в нея субстрат водороден пероксид. Представена по този начин реакцията оставя впечатлението, че на първият етап се получава едно единствено съединение, което пък поставя въпроса какво окислява на следващият етап анализираната субстанция, за да се получи детектируема реакция, не е ли това кислород, който е втори компонент от първата стъпка на реакцията? Под принципната схема е описано, че изследванията с пероксидаза са направени подобно на тези на Malik и Sing, но цитат на литература липсва.

2. Как е избран концентрационният диапазон за провеждане на изследванията с трите тествани субстрата фенол, резорцинол и парацетамол?

3. На стр. 72 в текста концентрациите на изследваните субстрати резорцинол и фенол са дадени съответно 0.09 mM/L до 1.8 mM/L и 0.1 mM/L до 2.2 mM/L, а в представените фигури (32a и 32b) същата концентрация е представена в mM. Кое от двете е коректното представяне, тъй като е ясно, че те не би следвало да са еднозначни? Последната глава от дисертационният труд е **Дискусия** върху получените от докторанта резултати. Тук той представя сравнителни данни и дискутира получените от него резултати в светлината на други подобни изследвания. Последнователно са дискутирани получаването на хибридните матрици, охарактеризирането им чрез съвременна FTIR спектроскопия, имобилизацията на пероксидаза върху тях и оптимизиране на условията за това, изследването на каталитичните свойства на свободната и имобилизирана върху различните матрици пероксидаза и детекцията на целевите съединения чрез новоконструирания биосензор. Представени и дискутирани са данните за операционна стабилност, повторно използване на сензора, линеен диапазон, отговор и т.н. Към тази част нямам критични бележки.

По т. 3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Автореферата на дисертационния труд напълно отговаря на изискванията на чл.11, т.5 от ППНСЗД на ХТМУ, като обхваща изцяло следните раздели от дисертационния труд Въведение, Цел и задачи, Резултати, Дискусия, Изводи, Основната част от материали и методи и Списък с публикациите и участията в научни форуми на докторанта по темата на дисертацията.

По т.4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

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

1. Синтез и охарактеризиране на нови дву- и трикомпонентни матрици за ковалентна имобилизация на ензими;
2. Изследване и оптимизиране на условията за имобилизация на пероксидаза от хрян върху новосинтезираните матрици;
3. Изследване и определяне на кинетичните параметри на свободна и имобилизирана върху новосинтезирани матрици, съдържащи SiO_2 , пероксидаза от хрян;

4. Дизайн, конструиране и изследване на параметрите на нов оптичен биосензор на основата на имобилизирана пероксидаза за детекция на токсични замързители (фенол и резорцинол) и фармацевтични продукти (парацетамол);

По т. 5. Мнение за публикациите на докторанта по темата на дисертационния труд

Към момента на представянето на дисертационния труд, същият е оформен в 3 научни публикации, от които 1 с импакт фактор 0.349 (в Bulgarian Chemical Communication) и 2 в специализирани научни списания без импакт фактор Bioautomation и Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie). Цитираните работи напълно удовлетворяват чл. 11 т.4 от ППНСЗД на ХТМУ за защита на дисертация.

По т.6. Критични бележки и коментари

Всички коментари, забележки и въпроси са представени в точка 2 при прегледа на дисертационния труд.

По т. 7. Лични впечатления от докторанта

Нямам лични впечатления от докторанта.

По т. 8. Заключение

Направените забележки и отправените въпроси за изясняване, същността на работата и постигнатите от докторанта резултати, в никаква степен не намаляват общото впечатление за значителна по обем извършена експериментална работа. Дисертационния труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които са изключително оригинални. Имайки предвид, че „доктор” е образователна и научна степен, докторантър Ахмед Хасан е изпълнил и двата аспекта на тази дефиниция. Във връзка с всичко изложено до тук ще подкрепя присъждането на образователната и научна степен „доктор” на Ахмед Хасан Анвар Хасан.

20.02.2016 г.

РЕЦЕНЗЕНТ. 

/доц. д-р Д. Даналев/