

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

„Оптичен биосензор с мултиензимни системи, имобилизирани върху хибридна мембрана, за определяне на инхибитори на ацетилхолинестераза”,

разработена от Нурелхода Медхат Махмуд Абас,

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”

по научна специалност 5.11. „Биотехнологии”

(“Биоорганична химия, химия на природните и на физиологично активните вещества”

(Заповед № НД-20-67/12.03.2012 г. на Ректора на ХТМУ)

Научен ръководител: Проф. д-р инж. Любов Йотова
Катедра „Биотехнология”
ХТМУ

Рецензент: Доц. д-р инж. Силиян Чаушев
Катедра „Инженерна химия”
ХТМУ

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

Нурелхода Медхат Махмуд Абас е родена на 21.10.1982 г. ОКС степен „Бакалавър” по биомедицинско инженерство получава през 2004 г. в Университета в гр. Хелуан, Египет. Магистърска степен по същата специалност придобива през 2009 г. в Университета в Кайро.

От 2010 г. е зачислена като редовен докторант в катедра „Биотехнология” на ХТМУ с научен ръководител проф. д-р Л. Йотова. Научните интереси на докторантката са в областта на биотехнологиите и биоаналитичната химия, свързани със създаването и приложението на биосензори.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд на тема *„Оптичен биосензор с мултиензимни системи, имобилизирани върху хибридна мембрана, за определяне на инхибитори на ацетилхолинестераза”* съдържа 141 страници текстова и графична информация. Съдържа 54 фигури и 24 таблици. Цитирани са 195 литературни източника, главно от последните две десетилетия.

В структурно отношение дисертационният труд се състои от четири глави. Първа глава представлява „**Литературен обзор**”, обхващащ 38 страници. В нея в критичен план докторантът е оценил съвременното състояние на проблема за създаването и използването на биосензорите за различни цели, например, в здравеопазването, при мониторинг на параметрите на околната среда, при определяне на биологични и химични агенти, в биотехнологията и др. Направена е прецизна и подробна класификация и характеристика на различните типове биосензори. В тази част на дисертационния труд докторантът е показал отлични възможности за критична оценка на известните фундаментални и приложни резултати в областта на биосензорите.

Като резултат от направения критичен литературен обзор са дефинирани целта и задачите на дисертационната работа, които са представени на стр. 41 на дисертационния труд.

Целта на дисертационната работа е създаване на биосензори на базата на оптични влакна чрез едновременно ковалентно имобилизиране на ензими за определяне на ацетилхолинестераза (*AChE*) върху нови хибридни мембрани.

За изпълнението на тази цел са формулирани следните конкретни задачи:

1. Синтез на нови хибридни мембрани.
2. Изследване на имобилизацията глюкозооксидазата (*GOx*) върху различни матрици.
3. Изследване на каталитичните свойства на индивидуално и едновременно имобилизираните ацетилхолинестераза (*AChE*), холиноксидаза (*ChO*) и пероксидаза от хрян (*HRP*).
4. Избор на най-подходящи мембрани за оптични биосензори.
5. Изследване на параметрите, влияещи върху функционирането на създадените оптични биосензори и създаване на математичен модел за оценка на въздействието им.
6. Изследване на влиянието на инхибитори (карбофуран и параксон) върху мултиензимните системи и измерванията с биосензор.
7. Определяне на влиянието на новосинтезирани производни на галантамина.

Втората глава на дисертационния труд „**Материали и методи**” е представена на 20 страници. В нея подробно са описани използваните експериментални техники за синтезиране на нови хибридни мембранни носители по метода зол-гел, които съчетават предимствата както на органичните, така и на неорганичните полимерни носители. Като неорганични прекурсори са използвани тетраетил-орто-силикат (TEOS), тетраметил-орто-силикат (TMOS), метил-три-етоксисилан (MTES) и етил-три-метоксисилан (ETMS). Компоненти с органичен произход в хибридните мембрани са целулозен-ацетат-бутират (CAB), целулозен-ацетат-пропионат с висока молекулна маса

(CAPH), целулозен-ацетат-пропионат с ниска молекулна маса (CAPL), а така също и съполимер на акриламид с акрилнитрил (AA/AN).

В третата част на дисертационния труд **“Резултати и дискусия”**, обхващаща 57 страници, са представени и критично дискутирани данните, получени при експерименталните изследвания

Според резултатите, представени в Таблица 3.1 (стр. 63 в дисертацията), най-добри резултати за имобилизиранения ензим *GOx* по отношение на показателя относителна активност са получени за мембрани № 5 (ETMS-CAB-AA/AN) и № 2 (TMOS-CAB-AA/AN) от хибридните и мембрани № 11 (CAB) и № 12 (AA/AN) от нехибридните. Изследвани са общо 12 мембрани.

Експериментално са охарактеризирани измененията на параметрите отн. активност, рН оптимум, температурен оптимум от имобилизациите на ензимите пероксидаза от хрян (*HRP*) (Таблица 3.2, стр. 64) върху 15 новосинтезирани мембрани, на ацетилхолинестераза (*AChE*) (Таблица 3.3, стр. 69) върху 4 мембрани и на холиноксидаза (*ChO*) (Таблица 3.4, стр. 74) върху 2 мембрани. Графично са представени стойностите на кинетичните параметри K_m и V_{max} за различните имобилизирани ензими. Общата тенденция, която е експериментално установена, се състои във факта, че стойността на константата на Michaelis-Menten K_m нараства значително след имобилизацията на съответните ензими върху различните носители в сравнение със стойността на K_m за свободния ензим. Според мен обяснението за този факт, направено в дисертационния труд, че това по-скоро се дължи на конформационни причини, отколкото на дифузионни ограничения, изисква по-нататъшни експериментални доказателства.

Извършени са изследвания на едновременната ковалентна имобилизация на ензимите *AChE* и *ChO* и на *AChE*, *ChO* и *HRP* върху две новосинтезирани хибридни мембрани, със състав, съответно ETMS-CAPH-AA/AN и MTES-CAPH-AA/AN. Получените експериментални данни за специфичната активност на мултиензимните хибридни мембрани по отношение на *AChE*, на *ChO* и на *HRP* са представени, съответно, в Таблица 3.6 и в Таблица 3.7. По-добрите показатели на специфичната активност са получени за мембраната ETMS-CAPH-AA/AN. Това е причината за нейния избор за създаване на оптичния биосензор.

Резултатите от експерименталните изследвания на оптичния биосензор за мултиензимната система *AChE-ChO* по отношение на чувствителността му спрямо ацетилхолина (*ACh*) са представени на фиг. 3.13 и Таблица 3.9. Представените в Таблица 3.9 данни дават добро съгласуване на показателите на двата типа биосензори.

Аналогични изследвания са извършени и за мултиензимната система *AChE-ChO-HRP*, резултатите от които са показани на фиг. 3.15 и Таблица 3.12. По отношение на стойността на параметъра време на отговор по-добър резултат (90 s) е

получен за оптичния биосензор във видимата област отколкото за кислородния биосензор (120 s).

Получените по експериментален път резултати дават основание да се приеме, че създадените от докторанта оптични биосензори се характеризират с приемлива точност и възпроизводимост на резултатите от измерванията. Това се потвърждава и от информацията, представена в Таблица 3.13, в която са сравнени показателите на създадените оптични биосензори с резултатите от изследванията на други автори.

Експериментално са изследвани инхибиращото действие на карбофурана и на параоксона за едновременно имобилизираните мултиензимни системи *AChE-ChO* и *AChE-ChO-HRP*. От представените графични зависимости на фиг. 3.23 и в Таблица 3.14 данни може да се направи изводът, че карбофуранът показва поведение на неконкурентен инхибитор за свободния и имобилизиран ензим *AChE*. Получените при изследванията резултати за стойността на константата на инхибиране K_i за системата *AChE-ChO-HRP* са по-добри от публикуваните в литературата.

Както се вижда от фиг. 3.26 и фиг. 3.29, получено е добро съгласуване на експерименталните данни с числените резултати от математичния модел за стойността на параметъра IC_{50} . Това потвърждава адекватността на създадения математичен модел за изчисляване на стойността на константата на инхибиране IC_{50} в зависимост от характера на процеса инхибиране.

В последната част от серията експериментални изследвания са изпитани пет различни вида нови пептидни съединения, производни на галантамина. Както е известно, галантаминът е инхибитор на ацетилхолинестеразата (*AChE*). Той редуцира действието на *AChE* и поради тази причина има склонност да увеличава концентрацията на ацетилхолина в мозъка. Предполага се, че това действие може да облекчи някои от симптомите на болестта на Alzheimer.

При експерименталните изследвания е установено, че четири от тези пет съединения имат инхибиращо действие върху ензима *AChE*. В Таблица 3.20 са представени стойностите на инхибиращата константа IC_{50} и видът на тези съединения. От представените в Таблицы 3.21, 3.22 и 3.23 резултати, както и от графично изобразените регресионни зависимости става ясно, че има задоволително съвпадение между експериментално определените данни за константата на инхибиране IC_{50} и числените резултати от решението на модела

Специално внимание заслужава разработеният математичен модел за времето на отклик на оптичния биосензор. Моделът отчита влиянието на следните параметри: коефициент на дифузия на субстрата в мембраната, дебелина на мембраната, начална концентрация на субстрата и кинетични параметри на ензимната реакция (K_m и V_{max}). От графичната информация, представена на фиг. 3.21 може да се види, че има добро

съвпадение между експерименталните данни и числените резултати от решението на модела и за двете хибридни мембрани.

Представените в четвърта глава изводи напълно отразяват резултатите, постигнати в хода на разработване на дисертационния труд и по съдържание съответстват на предварително формулираните цел и задачи на работата. В синтезиран вид те могат да бъдат обобщени в следните направления (в съответствие с глава четвърта „Изводи”, стр. 121 от дисертацията):

- Експериментално са изследвани характеристиките на четири имобилизирани индивидуални ензими върху хибридни мембрани – респективно, на глюкозооксидаза (*GOx*), на пероксидаза от хрян (*HRP*), на ацетилхолинестераза (*AChE*) и на холиноксидаза (*ChO*). Експериментално са определени стойностите на относителната ензимна активност, оптималните стойности на рН и на температурата в зависимост от характеристиките на матрицата.
- Създадени са оптични биосензори на базата на едновременна имобилизация на ензимите *AChE* и *ChO* и на *AChE*, *ChO* и *HRP* върху хибридни мембрани, които показват висока стабилност (съответно, 25 и 34 дни), кратко време за отговор (съответно, 90 s и 120 s) и широк линеен работен диапазон (съответно, $(2.5 \div 30) \cdot 10^{-3} M$ и $(2 \div 30) \cdot 10^{-3} M$).
- Формулиран е математичен модел за времето на отговор на оптичния биосензор. Определящи параметри в модела са ефективният коефициент на дифузия на субстрата в мембраната, дебелината на мембраната, началната концентрация на субстрата и кинетичните параметри на ензим-субстратния комплекс.
- На основата на получените числени стойности от решаването на създадения математичен модел за времето на отговор на оптичния биосензор с помощта на програмата MATLAB е установено добро съвпадение на експерименталните данни с числените резултати и за двете хибридни мембрани.
- Експериментално са установени чувствителността на едновременно имобилизираните ензимни комплекси към различни инхибитори – на карбофуран (представител на карбаматните пестициди) и на параоксон (представител на органофосфатните пестициди). При $I_{10}\%$ граничната стойност за откриване на карбофурана е $2,1 \cdot 10^{-8} M$ за *AChE-ChO* биосензор и $1,6 \cdot 10^{-8} M$ за *AChE-ChO-HRP* биосензор.
- Експериментално са определени границите на чувствителност на едновременно имобилизираните ензимни комплекси към новосинтезирани пептидни инхибиторни съединения, производни на галантамина. Съществуват данни, че

такива вещества могат да се използват успешно при лечение на болестта на Alzheimer. За биосензора *AChE-ChO* е установен линеен отговор в концентрационни граници $(5 \div 100) \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

3. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

По темата на дисертационния труд са направени следните публикации:

3.1. В международни и национални специализирани издания

Общо: 2 бр.

3.2. Симпозиуми и международни конференции

Общо: 5 бр.

Както се вижда от направения баланс на публикациите, техният брой е в съответствие с изискванията за придобиване на научно-образователната степен „доктор”, заложен в Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ.

Направените публикации отразяват коректно постигнатите резултати при разработване на дисертационния труд.

От представените за рецензия документи (дисертационен труд, автореферат) не става ясно дали по направените публикации не са открити цитати.

4. Критични бележки и коментари.

Основните ми критични бележки са следствие от констатираните грешни изписвания на думи (особено в автореферата на български език на дисертационния труд) и неясният смисъл на изреченията на някои места в текста на автореферата и дисертацията.

Според мен дисертационната работа би станала по-прегледна и приемлива за интересуващите се от проблема, ако след съдържанието бяха приложени списъци на фигурите и таблиците с техните наименования и място на разположение в дисертационния труд, както и списък на използваните символи, независимо от факта, че те са обяснени в текста на дисертацията.

Бих искал докторантът да коментира следните въпроси:

1. Каква е причината за избора на глюкозооксидазата като „моделен” ензим?
2. Какви са причините за получените резултати в Таблица 3.1 от гледна точка на структурата на използваните неорганични прекурсори в състава на хибридните мембрани?
3. В каква насока трябва да се концентрират бъдещите изследвания за подобряване на параметрите на оптичните биосензори?

5. Лични впечатления за дисертанта

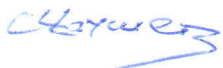
Личните ми впечатления от дисертанта са от моите пребивавания на територията на катедра „Биотехнология“ като лектор по дисциплината „Симулиране на биотехнологични инсталации“ и дискусии с докторанта и нейния научен ръководител проф. Йотова по някои въпроси от дисертационния труд преди нейното обсъждане пред катедрения съвет на катедра „Биотехнология“. Според мен Нурелхода е мотивиран млад изследовател със сериозни перспективи за развитие в областта на научните си интереси.

6. Заключение

Авторефератът напълно отразява резултатите и постиженията в дисертацията и са отстранени всички пропуски, установени в дисертацията. Това ми дава основание да препоръчам неговото отпечатване.

На основата на направения анализ на качеството на изследванията в дисертационната работа, използването на съвременни аналитични методи за анализ и идентификация, направените публикации, актуалността на темата на изследванията, изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ препоръчвам на Уважаемото научно жури да присъди на докторанта Нурелхода Медхат Махмуд Абас образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и на физиологично активните вещества“.

25.04.2012 г.

Рецензент: 
Доц. д-р инж. Стилиан Чаушев