

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационния труд на инж. Нурелхода Медхат Махмуд Абас, докторант към катедра „Биотехнология“ Химикотехнологичен и металургичен университет, за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност 01.05.10 Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества на тема:

Оптически биосензор с мултиензимни системи имобилизирани върху хибридни мембрани за определяне инхибитори на ацетилхолинестераза

от проф. Диана Христова Петкова, д.б.н, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Значение и актуалност на проблема

В последните години създаването на сензори за определяне на следови количества от различни замърсявания в околната среда, качеството на храни и промените в метаболитни продукти при различни патологични състояния се утвърждава като една много перспективна област за развитието на чувствителни техниките за анализ. Поради своята висока специфичност при взаимодействия с определени вещества и чувствителността им към малки промени в околната среда биомакромолекулите са един много удачен елемент за създаване на високоселективни сензори. В литературата има данни за създаване на биосензори за бързо определяне на следови количества на различни метаболити в кръвта като глюкоза, невротоксини, уреа, аминокиселини, креатинин, антибиотици. Едни от най-често използваните биомолекули за дизайн на биосензори са имобилизираните ензими поради голямата си специфичност за дадени субстрати, възможността за възстановяване на реакционната им способност след отделяне на продукта и многократно протичане на ензимната реакция. Освен приложение за определяне на различни замърсявания и метаболити биосензорите могат да намерят приложение за разкриване механизмите на някои междумолекулни взаимодействия и тестване на нови фармацевтици за терапия на различни патологии. От всичко казано до тук става ясно, че създаването на биосензори е една много актуална и с голямо значение област на науката, която намира много голямо приложение в екологията, хранителната промишленост и медицината.

Целта на настоящия дисертационен труд е конструиране на биосензор на основата на оптични влакна и мултиензимни системи, имобилизирани върху новосинтезирани хибридни мембрани за определяне инхибитори на ацетилхолинестеразата. Тя е много точно и ясно формулирана и изборът на конкретните задачи чрез решаването, на които да се даде отговор на поставения проблем са много добре подбрани. Представената схема много добре илюстрира последователността на поставените задачи.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд обхваща 140 стр, от които 40 стр. Литературен обзор, 17 стр. Методи, 47 стр. Резултати и дискусия, 5 стр. Заключение, 17 стр. списък на цитираната литература. Дисертацията е оформена отлично като за илюстрация на принципната структурата и действие на биосензорите, структурата на оптичните влакна, механизма на действие на ацетилхолинестеразата и по-важни структурни формули на използваните химични вещества в обзора са представени 13 фигури. Резултатите са илюстрирани с 36 фиг. и 23 таблици. Съотношението между отделните раздели е добре спазено и отговаря на изискванията за структура на дисертационен труд.

Анализ на дисертационния труд

В литературния обзор са разгледани различни видове биосензори, характеристиките им и е направен сравнителен анализ на слабостите и преимуществата на отделните видове. Подробно са описани основните принципи на различните видове оптичните биосензори. Отделено е специално внимание на до сега съществуващите биосензори за детекция на инхибитори на ацетилхолинестеразата. Преставени са литературни данни за структурата, механизма на действие и ролята на ацетилхолинестеразата в социално значими заболявания като болестта на Алцхаймер, някои автоимунни заболявания. Описани са различни видове инхибитори на ензима като значително внимание е отделено на пестицидите. Разгледани са няколко вида пестициди, техния метаболизъм и причините за токсичното им действие върху човешкия организъм.

Голяма част от обзора е посветен на използването процесите на биокатализата при биосензори за пестициди. Описани са до сега използваните матрици и методи за имобилизация. В заключение е отбелязано, че поради голямото приложение на сензори за инхибитори на ацетилхолинестеразата е необходимо тяхното усъвършенстване в посока чувствителност, лесно приносима конструкция, време на отговор и цена.

Прави впечатление логично и ясно написания обзор. По-голямата част от използваната литература е след 2005 г., което говори че авторката е запозната със съвременните тенденции при дизайн на биосензори, необходимостта от усъвършенстването им, принципите на имобилизация на ензимите и биокатализата, необходимостта от мултиензимни биосензори за детекция на следови количества инхибитори на ацетилхолинестеразата.

За изпълнение на поставената цел са използвани съвременни методи за синтез на хибридни мембрани, имобилизация на ензими с цел запазване на каталитичната им активност, едновременна мобилизация на няколко ензима. Използван е и математически модел за оптимизация и характеризиране на биосензор с оптични влакна. Подробно са характеризирани кинетиките на свободните и имобилизирани ензими, както и методите за определяне константите на инхибиране на ацетилхолинестеразата от различни видове инхибитори. Всички техники са много подробно описани и могат да бъдат възпроизведени без да се използва допълнителна литература. Считам, че подбраните методики са абсолютно адекватни за решаване на посочените задачи. Многобройните методи, които са използвани показват, че дисертантката е един много добре изграден експериментатор в областта на синтез на различни матрикси, биокатализ, дизайн на биосензори, тестиране на техните характеристики.

В глава Резултати и Дискусия са описани данните от експериментите проведени за решаване на поставените задачи.

А. Конструирание на биосензор с мултиензимна система.

1. Синтезирани са различни видове нови хибридни мембрани на основата на тетраетил ортосиликат (TEOS), тетраметил ортосиликат (TMOS), метилтриетоксисилан (METS) или етилтриметоксисилан (ETMS). Тези материали съдържат и органична част като целулозо ацетат бутират (CAB), целулозо ацетат пропионат с високо молекулно тегло (CAPH) и с ниско молекулно тегло (CAPL) и като кополимер акриламид и акрилонитрил(AA/AN).

2. За определяне на най-удачната матрица за имобилизация на ензимните молекули, които ще се използват при конструиране на бъдещите биосензори като тест система е използван ензимът глюкозооксидаза. След сравнение на кинетичните параметри на свободния и имобилизиран ензим е доказано, че най-висока ензимна активност се запазва при чисти мембрани от : CAB; чистия кополимер-AA/AN. От хибридните мембрани най-висока активност се запазва при ETMS,CAB,AA/AN.
3. Иmobилизацията на пероксидазата от хрян доказва, че този ензим запазва оптималните си свойства – активност, температурен и pH оптимум при : CAPL,AA /AN ; ETMS,CAPH,AA/AN; TMOS, CAPL,AA/AN т.е. предпочита матрикси синтезирани на основата на целулозоацетат пропионат. Въз основа на тези изследвания е предпочетена хибридната мембрана ETMS,CAPH,AA/AN тъй като от тези експериментите може да се заключи, че този матрикс предпазва ензима от денатурация.
4. Изследването на промените в свойствата на имобилизираната ацетилхолинестераза доказва, че независимо от настъпилите конформационни промени в ензимната молекула след имобилизация този ензим съхранява най-добре свойствата си при използване на същата хибридна мембрана ETMS,CAPH,AA/AN. Подобни предпочитания са установени и при имобилизация на холинооксидазата.
5. След като авторката е установила кой от новосинтезираните матрикси е предпочитан от отделните ензими, които ще участват при конструирането на новия биосензор тя си поставя следващата задача, а именно изследване на промените при едновременната имобилизация на два или три от използваните ензими. При тези изследвания отново е доказано, че най-удачни са ETMS,CAPH,AA/AN матрикси. Ето защо тези мембрани са използвани при конструиране на биосензорите за определяне на инхибитори за ацетилхолин естеразата
6. Новият биосензор е тестван за чувствителност към различни концентрации на ацетилхолин, време за отговор и стабилност. Доказано е, че биосензора дава линеен отговор в широк обхват на концентрации на ацетилхолина, което показва, че е с добра прецизност. Получените резултати са с добра възпроизводимост.

7. При мултиензимния биосензор съдържащ - ацетилхолин естераза, холин оксидаза и пероксидаза от хрян са определени времетраене на отговор и работен обхват. Тези стойности са приблизително еднакви с тези на биосензора с ацетилхолин естераза и холин оксидаза. Работната област е в границите на $2.5 \cdot 10^{-3}$ - $30 \cdot 10^{-3}$ М за ацетилхолина. Наблюдавана е добра възпроизводимост на резултатите за оптичния биосензор използвайки спектрофотометър или кислородната консумация. Коефициентите на стандартно отклонение за двата метода на измерване са много близки. Всичко това е индикация, че конструираният биосензор се отличава с висока прецизност и използваните нови нанохибридни материали и метода за имобилизация са адекватни за дизайн на биосензор на основата на оптични влакна. Характеристиките на новия биосензор са сравнени с тези на до сега съществуващите и е установено, че той има следните предимства – по-проста конструкция, ацетилхолин естеразата е имобилизирана ковалентно, линейността му се запазва в по-широки граници.
8. Един от най-важните параметри за всеки биосензор е времето за отговор. Чрез създадения математически модел е установено, че този параметър зависи: обратно пропорционално на коефициента на дифузия на мембраната; право пропорционално на дебелината на мембраната; право пропорционално на константата на Михаелис, но не зависи от V_{max} ; право пропорционално на началната концентрация на субстрата. Данните получени чрез прилагане на математическия модел корелират добре с експериментално получените резултати.

Б. Приложение на биосензора за определяне на инхибитори на ацетилхолин естеразата.

1. Определени са инхибиторните ефекти на карбофурана за ацетилхолинестеразата чрез биосензор със имобилизирани AChE и ChO чрез промени в консумацията на кислорода и ензимната активност на имобилизираните ензими. Определени са работния диапазон за концентрация на субстрата и константата на инхибиране. Кинетичните характеристики доказват, че този пестицид действа като аконкурентен инхибитор. Предимство на новия биосензор спрямо до сега съществуващите е по-големия афинитет към пестицида и това се дължи на използваните методи за имобилизация. Използвания математически модел за IC_{50} доказва

много добро съвпадение между теоретично получените и експерименталните резултати. Проведени са изследвания за ефективност на два вида съединения като реагенти за възстановяване на фосфорилирания биосензор. Установено е, че 2-РАМ възстановява биосензора почти до 90% от началната активност.

2. По-горе описаният метод е използван за определяне на параксона като инхибитор на ацетилхолинестеразата. Определен е работния обхват на биосензора, вида инхибиране и е доказано, че в този случай се касае за конкуретно инхибиране. Инхибиторният ефект на този пестицид е проучен и с AChE-ChO-HRP биосензор. Получени са същите данни за вида на инхибиране и е установено, че този биосензор е по-чувствителен от този с имобилизирани два ензима. 2-РАМ отново възстановява 90% активност и при този биосензор. Прилагането на математическия модел за определяне на IC_{50} отново показва много добро съвпадение с експерименталните резултати.
3. AChE-ChO биосензор е използван за доказване степента на инхибиторен ефект на ново синтезирани производни на галантамина- широко използван препарат при терапия на болестта на Алцхаймер като инхибитор на ацетилхолин естеразата. Използвани са два вида мембрани – на основата на ETMS и MTMS. Изчислените теоретични стойности за IC_{50} показват добро съвпадение с експериментално получените при използвани матриксни мембрани на основата на ETMS, докато при MTMS не се наблюдава такова съответствие при всички инхибитори. Доказано е, че новите инхибитори действат по механизма на конкуретното инхибиране. Имобилизацията на използваните ензими върху ETMS мембрани позволява по-голям афинитет на ацетилхолинестеразата към новите инхибитори.

Бих искала да задам няколко въпроса на докторантката:

1. Как може да се обясни запазването на сравнително високата активност на имобилизираната холин оксидаза в сравнение със свободния ензима, а същевременно е определена увеличена стойност на K_m ?
2. Как ще обясните понижението на K_i за имобилизираната ацетилхолин естераза в сравнение със свободния ензим? В дисертацията този факт е обяснен с настъпващи конформационни промени в молекулата на ензима след

взаимодействие с инхибитора, но такива промени настъпват и при взаимодействие на свободния ензим с инхибитора.

3. Имате ли обяснение за наблюдаваните различия в афинитета на имобилизираната ацетилхолин естераза към новополучените производни на галантамина в зависимост от използваните хибридни мембрани след като и при двата случая имобилизацията се основава на ковалентно взаимодействия между мембраната и ензима?

Основният принос на докторантката е конструирането на нов оптичен биосензор с мултиензимни системи имобилизирани върху нови хибридни мембрани за определяне на различни видове инхибитори на холинестеразата.

Може да се каже, че дисертацията е оформена добре. Срещат се малък брой печатни и граматически грешки. Има и пропуски на някои страници като на стр. 10 е пропуснато уравнение (1.4), а на страница 13 - (1.10). На места в литературния обзор се срещат някои повторения. Страница VII със използваните съкращения не е поставена на съответното място.

Резултатите от дисертацията са публикувани в 2 научни статии. Една от тях е в списания с ИФ, а другата е в българско специализирано списание. Проведените изследвания са представени и на 4 научни конференции 2, от които са с международно участие.

Авторефератът включва основните резултати от проведените изследвания и напълно отговаря на структурата на дисертацията..

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да кажа, че е конструиран високочувствителен биосензор, с възможност за широк диапазон на изследваните концентрации, със стабилна активност във времето, лесно регенериращ се, на основата на нови хибридни материали, лесно преносим, с кратко време за отговор, успешно приложен за определяне на инхибиторните свойства на новосинтезирани инхибитори на ацетилхолин естеразата. Въз основа на това предлагам на членовете на научното жури назначено със заповед No НД-20-68/ 12.03.2012 от Ректора на Химикотехнологичен и металургичен

университет да присъди на инж. Ноурелхуда Медхад Махмуд Абас научната и образователна степен „доктор” по научната специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества „

24.04 .2012 г.

Рецензент:



Проф.. Диана Петкова