

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Кирил Костов Симитчиев, дх
катедра „Аналитична химия и компютърна химия“, Химически факултет при
Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“,
на основание на заповед № Р-2051/18.07.2023

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в
област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление
7.1 Медицина, докторска програма „Медицинска биология“

Автор: Десислав Грозев Томов, докторант на самостоятелна подготовка към катедра
„Медицинска биология“, Медицински факултет при Медицински Университет - Пловдив

Тема: „Определяне на оксидативен стрес чрез използване на течна хроматография
с мас спектрометрична детекция“

Научен ръководител: акад. проф. д-р Добрин Аврамов Свиначков, дмн -
Медицински Университет - София

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Докторантът е зачислен със заповед на Ректора на МУ-Пловдив № Р-2750/02.11.2022 г. и отчислен с право на защита с решение на ФС на Медицинския Факултет при МУ-Пловдив (протокол № 5/12.07.2023 г.). На база на решението на ФС на МФ при МУ-Пловдив е издадена заповед на Ректора на МУ-Пловдив за отчисляване с право на защита № Р-2035/14.07.2023 г. Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г, като включва всички изисквани документи.

Докторантът е приложил 3 бр. публикации по тематиката на дисертационния труд, индексирани в международната база данни Scopus. Две от публикациите паралелно са индексирани в платформата Web of Science.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Д-р Десислав Томов завършва медицина през 1999 г. в Медицински Университет - София. През 2012 г. придобива специалност по Клинична лаборатория в Медицински Университет - Пловдив. В периода 2015 – 2019 г. е ръководител на лабораторията за течна хроматографски масспектрометричен анализ към „Технологичен център за спешна медицина - Пловдив“. От 2019 г. продължава с работата в областта на хроматографското разделяне в комбинация с масспектрометрична детекция от позицията на лекар-ординатор към катедра „Биоорганична химия“ към Фармацевтичен факултет при Медицински Университет - Пловдив. В периода 2018 - 2020 г. д-р Томов е участвал в курсове за повишаване на квалификацията си в областта на хроматографския анализ и химичната метрология, организирани от престижни международни и национални университети. През 2022 г. е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Медицинска биология“ при Медицински Университет - Пловдив.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

В дисертационния труд на д-р Томов ясно се забелязват две актуални направления, в които са проведени системни научноизследователски проучвания. Това са: 1) разработването и валидирането на два нови метода за анализ на 8-изопростагландин-Ф2-алфа (8-iso-PGF2-alpha), съответно в кръвна плазма и слюнка и 2) изследване на потенциала на 8-iso-PGF2-alpha като биомаркер за оценка на оксидативен стрес при две групи пациенти, а именно с автоимунен тиреоидит на Хашимото и индивиди преминали през процедура по поставяне на металокерамична конструкция в устната кухина. Може да се обобщи, че темата на дисертационния труд и проведените изследвания са актуални и от съществена значимост както за рутинната клинично-лабораторна практика, така и за медицинската наука. Целта и задачите в дисертационния труд са поставени коректно и адекватно и тяхната реализация води до получаването на информативни резултати, на базата на които могат да бъдат направени съответните изводи и заключения.

4. Познаване на проблема

Изграждането на дисертационния труд е базирано на решаването на мултидисциплинарни проблеми, което безспорно засилва значимостта на научната разработка. В глава „Литературен обзор“ докторанта показва, че е отлично запознат с процесите на образуване на свободни радикали и тяхното влияние върху човешкия организъм. Познава методите за оценка на оксидативен стрес, в частност чрез определяне на съдържанието на изопростани като продукт от взаимодействието на свободните радикали с естерите на арахионовата киселина, влизаща в състава на фосфолипидите в клетъчните мембрани. Докторантът е запознат в детайли с инструменталните подходи за количествен анализ на изопростани в биологични матрици. Прави впечатление системното познаване на маспектрометричните методи за молекулен анализ.

Видно е, че д-р Томов познава задълбочено проблемите и публикуваните до момента резултати по темата на дисертационния труд. Цитираните източници са съвременни (58% са от последните 10 години), подбрани са целесъобразно и са информативни. Литературният преглед представя докторанта като изследовател с възможност да интерпретира и критично да оценява постигнатите до момента научни постижения. От представения литературен обзор и подробната коректно въведена библиография може да се заключи, че докторантът демонстрира способност за задълбочен и критичен анализ на научната информация.

5. Методика на изследването

Проведената научноизследователска дейност е коректно планирана и изпълнена. Получените резултати са отчетени достоверно и са подложени на подробен статистически анализ. Прави впечатление, че д-р Томов е усвоил работата и използва целесъобразно специализирани софтуерни продукти за опериране с инструментална техника за анализ (високоэффективен течен хроматограф с тандемна маспектрометрична регистрация) и статистическа обработка на първични данни.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен на 109 страници, онагледен е с 31 фигури и 26 таблици. Представената библиография обхваща 159 литературни източника (92 са от последните 10 години; 3 са на български език).

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана и успешно постигната. Поставените четири конкретни задачи са съобразени с дефинираната цел и действително допринасят за нейното реализиране. Разработени и валидирани са два нови метода за анализ на 8-изопростагландин-Ф2-алфа, съответно в кръвна плазма и слюнка, чрез използването на една от „най-мощните“ инструментални техники за молекулен анализ, а именно комбинацията от високоефективна течна хроматография с тандемна масспектрометрична регистрация (HPLC-MS/MS). Разработеният метод за анализ на 8-iso-PGF2-alpha в кръвна плазма успешно е внедрен в клинично лабораторната практика при изследване на пациенти с автоимунен тиреоидит на Хашимото. Иновативният подход за анализ на 8-iso-PGF2-alpha в слюнка е приложен в проучване на индивиди преминали през процедура по поставяне на металокерамична конструкция в устната кухина. И в двата случая на приложение на разработените методи се поставя целта да се проучи потенциала на 8-изопростагландин-Ф2-алфа като биомаркер за оценка на оксидативния стрес в човешкия организъм.

Резултатите и тяхното **обсъждане** са представени в един общ раздел. Резултатите са систематизирани в логична последователност и съответстват на поставените задачи. Цялостната процедура за анализ на 8-iso-PGF2-alpha в кръвна плазма (слюнка) се провежда на три етапа: 1) предварително разделяне на анализа от биологичната матрица чрез течнотечна екстракция; 2) течнотечноточност хроматографско разделяне на компонентите на получения екстракт и 3) масспектрометрична детекция. Прави впечатление, че докторантът е оптимизирал всеки един от тези етапи поотделно. При анализът на кръвна плазма са проучени четири, а в случая на работа със слюнка са тествани 11 процедури за предварителна течнотечна екстракция на 8-iso-PGF2-alpha. Изборът на оптимален подход за екстракция е базиран на постигането на най-високи аналитични добиви и същевременно възможно най-ниска проява на матрични ефекти при инструменталния анализ. При оптимизация на хроматографското разделяне са проучени две различни търговски достъпни хроматографски колони, като за следващи експерименти е подбрана колоната, при която се постига по-високо съотношение сигнал-шум при масспектрометричната регистрация на 8-iso-PGF2-alpha. Оптимизирани са условията, при които се провежда тандемната масспектрометрична регистрация (MS/MS), а като калибрационна стратегия е използван метода на вътрешния стандарт с деутериран 8-iso-PGF2-alpha. Вътрешният стандарт се добавя към пробата преди изолирането на анализа чрез течнотечна екстракция като по този начин сумарно се коригират неспектралните матрични ефекти, които могат да възникнат в различните етапи на цялостната процедура за анализ, включително частичен аналитичен добив при предварителното изолиране на 8-iso-PGF2-alpha чрез течнотечна екстракция. Важно наблюдение, което е установено от докторанта е факта, че прилагането на калибрационна стратегия по имитирана матрица води до съпоставими резултати с тези получавани чрез калибрация по метода на стандартната добавка. Това улеснява провеждането на анализа и е благоприятен фактор за внедряване на процедурата в клинично лабораторната практика. Разработените методи са валидирани по отношение на набор от характеристики като точност, прецизност, граница на откриване, граница на определяне и

стабилност на пробите. При анализа на кръвна плазма е доказана добра устойчивост на метода при работа с липемична, иктерична и хемолизирана проба.

Докторантът е определил нивата на 8-iso-PGF2-alpha в кръвна плазма на 95 пациента с автоимунен тиреоидит на Хашимото и на 21 клинично здрави индивида в качеството на контролна група. Получените резултати са подложени на статистически анализ за оценка на потенциала на 8-iso-PGF2-alpha като биомаркер за оксидативен стрес. В групата на пациентите са установени по-високи концентрации на 8-iso-PGF2-alpha спрямо контролната група. При пациентите с автоимунен тиреоидит на Хашимото допълнително е проучена връзката между съдържанието на 8-iso-PGF2-alpha в кръвната плазма и фактори като тиреоиден статус, пол, индекс на телесна маса, нива на анти-тироидпероксидазни и анти-тиреоглобулинови антитела.

Разработеният метод за определяне на 8-iso-PGF2-alpha в слюнка е използван за анализа на проби, получени от 35 индивида, на които е поставена протетична конструкция в устната кухина. Определена е динамиката на нивата на 8-iso-PGF2-alpha във времето (преди поставяне на конструкцията, на 2 час и на 7 ден) в стимулирана и нестимулирана слюнка. Оценена е корелацията между съдържанието на 8-iso-PGF2-alpha и концентрацията на метални йони (Co^{2+} , Cr^{3+}), мигрирали от металокерамичната конструкция в слюнката.

При **обсъждането на собствените резултати** докторантът предлага обобщения, систематизиране и сравняване с резултатите на други автори и колективи, като постулира и собствени хипотези. Въпреки това към докторанта може да се отправи общ апел за стремеж към по-задълбочено и обстойно обсъждане на представените резултати.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

В дисертационният труд са представени 4 извода, формулирани са 5 приноса с оригинален характер и 4 приноса с потвърдителен характер. Посочените приноси могат да се класифицират като научно-приложни и включват разработването и валидирането на два нови аналитични метода за анализ на 8-изопростагландин-Ф2-алфа в кръвна плазма и слюнка. Важно е да се отбележи, че предложените методи не обхващат само експлоатацията на съвременна инструментална техника (високоэффективна течна хроматография с тандемна маспектрометрична детекторна система), но включват и оптимизирани процедури за предварително разделяне и концентриране на целевия аналит чрез течна-течна екстракция. Предложените процедури за подготовка на пробите (кръвен серум и слюнка) се характеризират с леснота и бързина на изпълнението и не изискват специализирана апаратура за провеждането им. Към момента разпространението на HPLC-MS/MS системите в рутинните лаборатории е сравнително ограничено поради високата цена на инструменталната техника и необходимостта от висококвалифицирани кадри, които да работят с нея, но въпреки това разработените от докторанта методи имат потенциала да се внедрят в клинично-лабораторната практика. В дисертационния труд се реализира такова приложение и успешно се потвърждава, че определянето на концентрацията на 8-iso-PGF2-alpha в биологични проби може да се използва като адекватен маркер за оценка на оксидативния стрес в човешки организъм. Като перспективи за развитие може да се посочи

натрупването и представянето на повече резултати в подкрепа на Извод № 4, Приноси с оригинален характер № 4 и 5, и Принос с потвърдителен характер № 4.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантът е приложил 3 бр. научни публикации по тематиката на дисертационния труд, реферирани в международната база данни Scopus (1 бр. – Q2 и 2 бр. – Q3). Две от публикациите паралелно са реферирани в платформата Web of Science (2 бр. – Q4, сумарен IF = 4.657). Всичките три публикации са публикувани в международни списания на английски език. В една от публикациите д-р Томов е първи автор, а в другите две е на второ място в авторския колектив. По справка направена в Scopus към 30.08.2023 г. са забелязани 3 независими цитата на приложените от докторанта публикации. Същевременно докторантът е представил 3 и участва в авторския колектив на още 2 доклада, представени на научни форуми. Прави добро впечатление участието на д-р Томов в два научно-приложни проекта, чийто резултати са включени в дисертационния труд.

9. Лично участие на докторанта

Базирано на формалния преглед на дисертационния труд и съпътстващите го публикации може да се прецени, че докторанта е изпълнявал водеща роля при провеждането на научните изследвания и има съществен принос към придобиването на постигнатите резултати.

10. Автореферат

Авторефератът е изготвен в съгласие със съответните изисквания. Оформен е на 43 страници като съдържанието му отговаря на поставените задачи и получените резултати.

11. Критични забележки и препоръки

11.1. При описание на процедури 1-4 (стр. 53-54) се посочва, че „...три са от предишни публикации, и една – модификация на разработена от проф. Свинаров и хим. Касабова...“. За читателя не е ясно (липсват цитати на литературни източници), коя е модифицираната процедура и дали докторанта влиза в състава на авторския колектив, разработил останалите три процедури. В дисертационния труд като оптимална се определя „процедура 3“, но отново е неясно дали тя произлиза от литературен източник или е разработена с участието на докторанта. Аналогично при описанието на процедури 1-11 (стр. 70-72) не е уточнен техния произход – от литературен източник или собствена разработка на докторанта.

11.2. В дисертационния труд се забелязва дублиране на представените резултати, което следва да се избягва в един научен текст. Например, калибрационната права представена на Фиг. 15 е визуализирана също и на Фиг. 16. Аналогична е ситуацията с Фиг. 21 и Фиг. 22. Информацията, изобразена на Фиг. 23 се съдържа и във Фиг. 24. В Табл. 26 са представени данни, които също присъстват на Фиг. 28, Фиг. 30 и Фиг. 31.

11.3. На отделни места в раздел “V Резултати и обсъждане“ е препоръчително да бъде направено по-задълбочено обсъждане. Като пример може да се посочи, че резултатите представени в Таблици 15-18 и Таблици 22-23 са недостатъчно коментирани в текста на дисертационния труд.

11.4. Какъв е съставът на калибрационните стандарти, спрямо които е определен матричният ефект, визуализиран на Фиг. 9. Коя хроматографска колона е използвана при провеждането на експеримента – Hypersil BDS C18 или Accucore RP-MS?

11.5. Необходими са допълнителни пояснения какви екстракционни системи са представени на Фиг. 17. В случай, че се визуализира само стъпката на предварителна екстракция с хексан, то съдържанието на показаните шест епруветки би трябвало да е идентично и разделянето (a, b, c, d, e, f) в зависимост от използвания екстрагент на следващата стъпка в процедурата на разделяне е обръкващо.

11.6. В раздел „IV. Материали и методи“, точка „D. Статистически методи“ се споменава термина „ненормално разпределение“. По-коректна формулировка е „данни, които се отклоняват от нормалното разпределение“.

11.7. Редакционни бележки: В дисертационния труд липсва номерация на представените уравнения. В Табл. 15 матричният ефект се обозначава с буквите „MF“, което не съответства на съкращението „ME“, използвано в дефиниционното уравнение на стр. 63. На стр. 62., точка „1.2.2. Точност и възпроизводимост“, ред 11 вместо „Таблица 12“ би трябвало да се посочи „Таблица 14“.

12. Лични впечатления

Нямам натрупани лични впечатления за докторанта.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Безспорно предложените методи за анализ на 8-iso-PGF2-alpha в кръвна плазма и слюнка имат голям потенциал за внедряване в клиничната практика не само на национално, но и на международно ниво, поради което бих препоръчал извършеното валидиране на аналитичните процедури да се доразвие и синхронизира с изискванията, постулирани в стандарта БДС EN ISO 15189:2023 (Медицински лаборатории. Изисквания за качество и компетентност). Препоръчвам да бъдат положени усилия за създаването на бюджет на неопределеност на резултатите от измерване.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ


Дисертационният труд *съдържа научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ - Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ - Пловдив за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторанта д-р Десислав Томов **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност 7.1 Медицина (Медицинска биология), като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен 'доктор'** на д-р Десислав Грозев Томов в докторска програма по „Медицинска биология“.

30.08.2023 г.

Рецензент:



Заличено на основание
Чл.5 §1, 6. "В" Регламент (ЕС)2016/679

доц. Кирил Симитчиев, дх