

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р Екатерина Георгиева Борисова,
член на научно жури за провеждане на процедура на защита за присъждане на
образователна и научна степен “доктор”

Върху дисертационен труд на тема:

**Вискоеластични свойства на животински мейбомиеви липиди и взаимодействия
на полимери с компоненти на слъзния филм**

Професионално направление

4.3. Биологични науки (Молекулярна биология – Биологични мембрани)

Автор на дисертационния труд:

Петър Борисов Ефтимов

задочен докторант към Биологически Факултет
на Софийски Университет „Св. Климент Охридски”

*Научното жури е сформирано със заповед № РД 38-178/14.03.2017 г. на Ректора на
Софийския университет „Св. Климент Охридски”*

I. Обща характеристика на докторанта

Петър Борисов Ефтимов е магистър по Ветеринарна Медицина от Лесотехнически Университет-София от 2007 г. и бакалвър по Молекулярна биология от Биологически факултет на Софийски Университет от 2011 г.. Редовен докторант към катедра „Биохимия” на Биологически Факултет на СУ от януари 2013 г., като докторантурата му е трансформирана в задочна от ноември 2015 поради спечелен конкурс за асистент. Отчислен е с право на защита, поради изтичане на срока на докторантурата, считано от 01.02.2016 г.

Работил е като ветеринарен лекар към ветеринарна клиника „Анимо” (2005-2010), Централна Ветеринарна Клиника – София (2010-2011), ветеринарен кабинет „Природа” (2012 г.) и Вивариума на БФ (от 2015 г.). Бил е отговорник на екип за реанимация и спешна ветеринарна медицина в продължение на 4 години. В момента работи като преподавател в БФ на СУ - Асистент по Хистология и Ембриология.

Участва в два научно-изследователски и обучителни проекта към Фонд Научни Изследвания на МОН и към Оперативна Програма „Развитие на Човешките Ресурси” за подкрепа на докторанти, постдокторанти и млади учени.

Отличен е с награда за най-добре представил се млад автор към секция „Ветеринарна медицина и животновъдство” на XXIII международна научна конференция на Съюза на Учените.

II. Обща характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем от 147 страници и съдържа 42 фигури и 7 таблици. Цитирани са 304 литературни източника.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Биохимия“ и „Цитология, Хистология и Ембриология“ при Биологически факултет, както и в катедра „Оптика и спектроскопия“ при Физически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. Пробите от животни са взети във ветеринарна клиника «НОВА», гр. София.

Дисертационният труд е структуриран в раздели «Анотация», «Литературен обзор», «Цели и задачи», «Материали и методи», «Резултати», «Обобщение на резултатите», «Изводи», и «Приноси». Приложени са списъци на съкращенията, използваната литература, както и публикациите и участията в научни форуми на дисертанта, с материали, влезли в настоящия дисертационен труд.

Самият дисертационен труд е написан на литературен български език, практически без граматически и пунктуационни грешки. Изложението е представено ясно, сбито и изключително добре структурирано, както в частта на литературния обзор, така и в тази, където са представени собствените изследвания и експериментални резултати.

1. Цел и задачи на дисертацията

След предварителен анализ на съществуващите данни за влиянието на еластичността на мейбомиевите липиди върху стабилизирането на фазовата граница сълза/въздух *in vivo*, значението на гликокаликса за нормалното овлажняване на роговичния епител и извършена оценка за недостатъчни експериментални данни в тази област, които да обясняват добре взаимовръзката между състава и структурата на гликокаликса и омокрянето на очната повърхност, докторантът и неговия ръководител са формулирали следните цели на дисертационния труд:

1) Да се установи има ли взаимовръзка между повърхностните свойства на мейбомиеви липиди взети от различни животински видове и от човек и стабилността на слъзния филм при тези видове;

2) Да се установи дали мейбиумът е определящ за повърхностните свойства на животинските и човешки „цели сълзи“;

3) Да се установи има ли взаимовръзка между омокрянето на роговичния епител и състава и структурата на неговия гликокаликс.

За реализирането на тези цели са поставени 5 конкретни задачи. Тези задачи добре се вписват в общата постановка и очертават един кръг от нови въпроси, който напълно съответствува на избраната проблематика.

2. Литературен обзор

Докторантът работи върху този проблем от 2013 г. Той задълбочено е навлязъл в проблематиката и е много добре запознат с литературното ѝ състояние. Цитирани са общо значителния брой от 304 литературни източника – монографии и оригинални статии, от които 119 са публикувани през последните десет години, което е индикатор за актуалността на темата на дисертационния труд. Направен е огромен литературен обзор за периода 1948 - 2016 години, като са обхванати основните публикации по проблематиката на дисертационния труд, предоставяйки ясно и кратко наличната информация за синдрома на сухото око, по публикувани данни за хуманни и ветеринарни пациенти, както и методиките за анализ и диагностициране на това състояние.

Докторантът е оценил творчески наличния литературен материал и е разкрил основните нерешени въпроси, превръщайки ги в обект на своите собствени изследвания.

Литературният обзор обхваща 40 страници, т.е. около 27% от дисертационния труд. В тази част са представени основните биохимични, морфологични данни, както и методиките за анализ и определяне на синдрома на сухото око, като са разгледани критично техните възможности, точност на диагностициране и клинична приложимост

в хуманната и ветеринарна медицина. Тази част от дисертационния труд показва много добре изразената систематичност при работата на дисертанта с литературни източници, както и в разбирането и анализа на съществуващи експериментални методики и данни.

3. Материали и методика на изследванията

Разделът „Материали и методи“ заема 15 страници, което представлява около 10% от обема на дисертационния труд. Ясно, кратко, но изчерпателно са дадени описанията на приложените техники и използваните материали.

Използван е мейбомиев секрет и цели сълзи от кучета, котки, и зайци, като са спазени всички стандарти за Конвенцията за защита на гръбначните животни, използвани за експериментални и други научни цели, а в случаите на компаниялни животни (куче, котка) и с подписано информирано съгласие от техните стопани.

Използвани са две клетъчни линии на клетки на роговичен епител на заек и човек, закупени от съответните клетъчни банки.

Използвани са няколко физични и биологични методики за анализ, които спадат към най-актуалните в областта на такъв тип изследвания и в съчетание с подходящо приложените клетъчни моделни системи, позволяват постигане на поставените цели и решаване на експерименталните задачи на дисертационния труд на едно високо научно ниво.

Използвани са общо 6 различни експериментални методики, като по описанието в раздел «Материали и методи», и в «Резултати» личи отличната подготвеност на кандидата за тяхното използване, както и разбирането му за техните принципи на действие и прилагане.

Методиките са:

- 1) Изследване на омокряемост на повърхности чрез измерване на контактен ъгъл по техниката на седящото мехурче;
- 2) Измерване на повърхностното налягане на секрет от мейбомиеви жлези;
- 3) Наблюдение на мейбомиев филм чрез Брюстер-ъглова микроскопия;

След култивиране на клетки на роговичен епител и разработка на моделна система на слъзен филм върху тях са приложени:

- 4) Колориметричен метод за определяне на преживяемост (МТТ тест) на епителиални клетки от линиите на човешки и заешки роговичен епител;
- 5) Изследване на наличието на муцини (MUC 16), чрез имунофлуоресцентно маркиране;
- 6) Изследване на наличието на мембранно-асоциирани муцини чрез оцветяване с Роза Бенгал.

В този раздел са описани и методите за анализ на експерименталните данни, като са приложени три различни подхода за анализ, както следва:

- 1) Анализ на квази-равновесни компресионни изотерми;
- 2) Анализ на динамичните цикли на компресия/релаксация;
- 3) Анализ на дилатационните реологични свойства по метода на стрес-релаксациите.

Проведена е статистическа обработка на резултатите чрез едно-параметричен вариационен анализ (ANOVA), комбиниран с пост-ANOVA параметрични тестове, с подходящ специализиран софтуер.

4. Научни и научно-приложни резултати и приноси на дисертационния труд

Разделите «Резултати» и «Обобщение на резултатите» заемат 56 страници или почти 40% от обема на дисертационния труд. Подробно са изложени получените експериментални данни при приложението на различните експериментални методики за анализ. Описани са недостатъците и ограниченията на тези методики и какви изводи могат да се получат по наблюдаваните характеристики. Подходът на докторанта е критичен и по същество, затова получените обобщения и изводи не будят съмнение в своята значимост и експериментална коректност.

Приносите на дисертанта могат да бъдат класифицирани както като научни, така и като научно-приложни, като:

1) Сравнени са повърхностните свойства на мейбомиев секрет и цели сълзи на човек с бозайници с близки (куче, котка) и с много различни (заек) мигателна динамика и стабилност на слъзния филм. Това позволява да се предположи какви липидни видове на практика не повлияват характеристиките на липидно-белтъчния слой и какви амфибилни липиди, дори и в малки концентрации, силно модифицират повърхностните му свойства и стабилността;

2) Разработен е нов метод за оценка на взаимодействието между роговични клетъчни линии и агенти, повлияващи структурата на гликокаликса и омокрянето му;

3) Оптимизиран е протокол за получаване на стратифицирана култура от първична човешка роговична епителна линия и стимулиране на експресията на мембранно-асоциирани муцини. Тази стратифицирана култура, може да намери приложение, като максимално близък до *in vivo* системите модел за изследване на взаимодействието на фармакологични агенти с външната очна повърхност;

4) За първи път количествено е доказана връзката между степента на омокряне на роговичната клетъчна повърхност и мембранно-асоциираните муцини.

Тези приноси са както в направление основа за разработка на диагностичен подход при определяне на синдром на сухото око, така и за моделиране на взаимодействието с различни лекарствени форми за третиране на това състояние. Тези резултати, разработени подходи и модели имат значителна тежест, и бих препоръчала да се продължи активно работата в това направление на изследванията в търсене на конкретни експериментални и клинични приложения.

5. Оценка на автореферата на дисертационния труд

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява правилно основните положения и приноси в дисертационния труд.

6. Оценка на докладите и публикациите по дисертационния труд

Докторантът е представил списък с данни за публикации, доклади от участия в научни форуми и цитати на съответните публикации, свързани с темата на настоящия дисертационен труд, както следва:

- две статии в списания с импакт – фактор (в *European Biophysics Journal* (IF=1,444), и в *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (IF=0,373));

- една статия в специализирано реферирано научно списание на Съюза на Учените (*Science and Technology*).

Такъв брой публикации е повече от достатъчен по установените критерии при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление «Биологически науки» и «Биотехнологии».

Освен публикациите в научни списания има три представяния на научни доклади, от които два на международни и един – на национална научна конференция. За последният доклад дисертантът е удостоен с награда за най-добро представяне.

Публикациите са излезли от печат в периода 2015-2016 г., като вече е забелязан един цитат. В тях ясно е изразена водещата роля на дисертанта в проведените научни изследвания и в подготовката на самите статии, тъй като и в трите той се явява първи автор.

7. Въпроси и забележки към дисертационния труд

Структурирането не е в стандартната форма на глави на дисертационния труд, което не намалява качеството на изложения материал, но леко затруднява ориентирането в структурата му. Забелязва се също, че използваната литература се цитира в няколко различни формата (подреждането в частта на година на издаване, том, страници и т.н.), което затруднява работата при намиране и сверяване с литературните източници. Това са едни от малкото технически забележки към този дисертационен труд.

Забелязана бе една техническа неточност – на стр. 41 - «гел-формираните секреторни муцини са най-големите познати гликопротеини с молекулно тегло около 40 mDa.» - по всяка вероятност това трябва да се чете като “MDa”, тъй като по литературни данни муцините варират между 200kDa - до 200 MDa (Kesimer, Methods Mol. Biol., 2012).

Като цяло нямам значими технически забележки към дисертационния труд. Както вече бе споменато при оценката на дисертационния труд – той е написан на високо литературно, научно и техническо ниво, което го прави интересно и увлекателно четиво, както за тесни специалисти, фокусирали своите усилия в изследването на този синдром, така и за по-широк кръг учени, работещи в областта на биофизиката, биофотониката, биохимията и молекулярната биология.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният дисертационен труд характеризира дисертанта **Петър Борисов Ефтимов** като оформен млад учен, със задълбочена теоретична подготовка и с изяви експериментални способности и умения да провежда самостоятелни и прецизни изследвания в гранични области на молекулярната биология, биофизиката, ветеринарната и хуманната медицина с важно практическо приложение.

Представеният материал е напълно дисертабилен, темата е актуална и перспективна, експериментите са поставени методично правилно и са осъществени на високо съвременно ниво. Получените резултати са достоверни и са сериозна база за следващи научни и приложни разработки, включително на лекарствени средства и на методики за анализ на състоянието на пациенти със «синдром на сухото око», като в работата на дисертанта се открояват значителни научни и приложни приноси.

Имайки предвид оригиналността, значимостта и приложимостта на научните приноси и тяхното много добро представяне от докторанта, убедително препоръчвам на почитаемото Научно жури да присъди на **Петър Борисов Ефтимов** образователната и научна степен “Доктор”.

27.04.2017

Рецензент:

Доц. д-р Екатерина Борисова