

РЕЦЕНЗИЯ



На дисертационния труд „**Имунофлуоресцентен анализ на афлатоксин М1 в мляко**” представен за получаване на образователна и научна степен „**Доктор**” по научна специалност 02.11.11. “Технология на биологично активни вещества” от **МИЛКА КОЙЧЕВА АТАНАСОВА**

Рецензент: **Алберт Иванов Кръстанов**, професор, д.т.н.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е посветен на актуален и интересен проблем, отнасящ се за разработката на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ, базиран на магнитни наночастици, за определяне на афлатоксини. Конкретният обект е анализ на афлатоксин М1 в мляко – изключително актуален с оглед контрол на безопасността на храните и здравословното хранене. За определяне на концентрацията на афлатоксин М1 в мляко и млечни продукти са разработени редица методи (HPLC, ELISA, имунохроматографски тестове), но най-подходящи с оглед бързина, чувствителност и ниска цена се оказват имунофлуоресцентните методи, като хетерогенният флуоресцентен имуноанализ се предпочита пред хомогенния. Фактът, че в научната литература няма разработени хетерогенни имунофлуоресцентни анализи за афлатоксин М1, доказва актуалността и значимостта на проблема, обект на настоящата дисертация. Предимствата на магнитните наночастици осигуряват по-добра чувствителност и бързина на имуноанализа, кратко време за имобилизация на антиялото и прости процедури за измиване и разделяне на магнитните наночастици с имобилизирани антитела и конюгати при провеждане на имуноанализа. Предложеният в дисертационния труд нов подход за анализ на афлатоксин М1 ми позволяват високо да оценя идеята, приложена в настоящата дисертация, да се използват магнитни наночастици като носител за имобилизация на антитела. Всичко това ми дава основание да считам, че изследванията направени от докторантката са актуални и значими и имат съществен принос за разработване и въвеждане на различни скрининг методи с висока производителност, използващи опростена преработка на хранителните проби. Като цяло в резултат на

разработката на дисертационния труд е създаден високочувствителен имунофлуоресцентен анализ за определяне на ниски концентрации на афлатоксин М1 в мляко на базата на имобилизирани антитела върху магнитни наночастици и флуоресцентен конюгат. Полученият анализ е сравнен с ELISA, базирана на магнитни наночастици за определяне на афлатоксин М1.

Предимствата на различните подходи при имобилизацията на моноклонални антитела и особено използването на магнитни наночастици, както и проблемите, стоящи за разрешаване при използването им, са обект на обобщение и критичен анализ в литературния обзор на представения труд. В него са обобщени и данните за различните видове имуноанализи, произход, свойства и разпространение на афлатоксините, както и тяхната токсичност и стабилност в мляко и млечни продукти. Обърнато е специално внимание на законодателството и регулацията на съдържанието на въпросните токсини в храни. Обобщени са и съществуващите методи за анализ на афлатоксин М1 в мляко и млечни продукти. Голяма част от информацията по темата на дисертацията е обобщена в таблици и фигури, което придава стегнат и нагледен вид на литературния обзор, без излишно многословие и разточителност в обясненията на отделните проблеми. Всички части на литературния обзор са логично свързани, което дава възможност на автора, обобщавайки и анализирайки информацията, логично да достигне до основната цел на дисертационния труд, а именно: да се разработи бърз и селективен тест, стабилен във времето, който да се комбинира с автоматичен флуоресцентен апарат и да се осигури скринингов мониторинг на афлатоксин М1 в мляко, като фокусът е разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ, базиран на магнитни наночастици за определяне на афлатоксин М1 в мляко и млечни продукти. Амбициозна цел, която докторантката успява да реализира успешно. Литературният обзор е 43 страници и обхваща 180 литературни източника. Преобладаващата част от реферираните източници е от последните 10-15 години, включително и 2015 г. Ясно е показана тенденцията към интензифициране на изследванията през последните години и актуалността им в настоящия момент. Нещо повече, в него са застъпени и въпроси, които не са непосредствен обект на изследване, но разширяват познанията по темата.

Следвайки тази цел докторантката е изследвала условията за функционализиране на магнитните наночастици, условията за имобилизация на анти-афлатоксин М1 антитяло върху магнитни наночастици. Минава през разработване на флуоресцентен имуноанализ на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на афлатоксин М1 и, като финал на една значима работа, разработва сравнителен ензимно свързан имуносорбентен анализ на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на афлатоксин М1. Като логично следствие е и направеното сравнение на разработените имунофлуоресцентен и имуноензимен анализ за определяне на афлатоксин М1 в мляко. Разработката завършва с един много съществен принос от приложен характер, а именно, интегриране на имунофлуоресцентния конкурентен анализ със CD-базирано устройство LACTOSCAN за автоматично определяне на афлатоксин М1 в мляко. Така дисертационния труд придобива комплексен характер със задълбочените изследвания върху създаването на един аналитичен метод и неговото практическо приложение.

Считам, обаче, че един по-критичен поглед върху приложението на магнитните наночастици като носители за имобилизация на протеинови структури, би бил от полза за да се обоснове изборът на конкретно тези носители за имобилизация на проучваните моноклонални антитела.

В заключение държа да подчертая, че независимо от направената забележка, литературният обзор, със своята всеобхватност, представлява богата информационна база за правилно насочване на изследванията. Степента на познаване на състоянието на проблема е много висока, което дава възможност докторантката да надгради постигнатите до сега резултати и да допринесе за развитие на проблематиката, обект на дисертацията.

Разделът „Материали и методи“ показва разнообразната методична база, използвана при изследванията. Прави впечатление балансираното и умело съчетание на биологически и химически знания, което е особено важно за успешното провеждане на експериментите по конкретните изследвания. Усвоени и приложени са разнообразни

методи за синтез и функционализиране на магнитни наночастици, имобилизация на антитела, анализ на техните биохимични и операционни характеристики, много инструментални методи за анализ. Едновременно с успешното използване на тези методи са направени важни методични приноси – **разработен е бърз, чувствителен и селективен флуоресцентен имуноанализ на основата на магнитни наночастици за определяне на афлатоксин М1 в мляко; разработен е ензимно свързан имуносорбентен анализ на основата на магнитни наночастици за определяне на афлатоксин М1 в мляко.** Разработеният имунофлуоресцентен метод за анализ афлатоксин М1 е интегриран със CD-базиран автоматичен флуоресцентен анализатор. Това показва значимостта на научно-приложните приноси на дисертационния труд, на което аз давам много висока оценка.

Доминираща част от дисертацията заемат резултатите и дискусията, които са оформени в раздели в зависимост от конкретните изследвания. В тази част се открояват няколко по-важни научни и научно-приложни приноси:

- Получени са функционализирани магнитни наночастици с диаметър 147 nm и е имобилизирано моноклонално антитяло срещу афлатоксин М1 върху тях.
- Синтезиран е, пречистен, доказан и лиофилизиран флуоресцентен конюгат афлатоксин М1-оксим-флуоресцеинамин.
- Разработен е бърз, чувствителен и селективен флуоресцентен имуноанализ на основата на МНЧ за определяне на афлатоксин М1 в мляко.
- Синтезиран е, пречистен, доказан и лиофилизиран конюгат афлатоксин М1-оксим-BSA-HRP.
- Разработен е ензимно свързан имуносорбентен анализ на основата на магнитни наночастици за определяне на афлатоксин М1 в мляко.

Всички резултати са онагледени добре, което дава възможност на читателя да се ориентира лесно в богатия фактологически материал. Резултатите са представени на 27 фигури и 7 таблици. Описани са добре, но в доста от случаите липсва задълбочена дискусия, която да открие постигнатите от автора резултати и научно-приложни приноси. В тази връзка би било добре разделът „Резултати и дискусия“ да завърши наистина с дискусия и обобщение, където да се акцентира върху логическата връзка антитела-

имобилизация-приложение в светлината на постигнатите до този момент резултати и приносите на представения труд. Това би дало възможност и изводите да бъдат представени по друг начин, наистина като изводи на базата на получените резултати, а не като кратко резюме на тези резултати. Независимо от това ярко се открояват някои съществени постижения като:

- Разработен е флуоресцентен имуноанализ на базата на функционализирани магнитни наночастици.
- Проведена е успешна имобилизация на анти-афлатоксин М1 антители върху магнитни наночастици.
- Постигнати са много добри аналитични характеристики на получения имунофлуоресцентния анализ за афлатоксин М1.
- Имунофлуоресцентният анализ е приложен в реални проби и е установено, че той има висока прецизност и аналитичен добив.
- Определена е много добра корелация между разработения имунофлуоресцентен анализ и търговския ELISA тест.
- Разработен е сравнителен ензимно свързан имуносорбентен анализ на базата на магнитни наночастици.
- Постигнати са много добри аналитични характеристики на получения МНЧ-ELISA за афлатоксин М1.

Приносите на дисертационния труд определено водят до получаване на нови знания в дадената научна област чрез изразените нови зависимости, изводи и заключения, доказани със съвременни методи и средства на утвърдени теории в ензимологията. Като цяло дисертационният труд представлява добре обосновано, комплексно и завършено научно изследване със значими научно-приложни приноси.

Независимо от някои малки пропуски при цялостното оформяне на дисертационния труд не може да не отбележим, че част от резултатите са публикувани в едно много сериозно издание: *"Analytical letters"*, както и в *"Book of Abstracts BIOMATSEN 2016 Istanbul"* и *"Научни трудове на Русенския университет"*. Общо 4 публикации (1 в издание с импакт фактор) и 2 участия в конференции, което е обективна оценка за качеството на експерименталната работа и важността на получените резултати за развитието на това научно направление. Докторантката не спира до тук, а дава и насоки за практическото приложение на тези методи, което е принос с приложен характер.

В заключение, представеният за рецензия труд, както и, разбира се, публикуваните материали имат научни, научно-приложни и методични приноси. Дисертацията отговаря на изискванията за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Това, заедно с всичко изложено по-горе, ми дават основание да предложа на уважаемото научно жури да даде на **МИЛКА КОЙЧЕВА АТАНАСОВА** образователната и научна степен „Доктор“.

02.05.2017

Пловдив

Рецензент:

(проф. д-р Алберт Кръстанов)