

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационния труд представен от Светла Иванова Стоянова за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

От проф.д-р инж. Любов Константинова Йотова – катедра „Биотехнология“ – ХТМУ-София , утвърдена със заповед № УМО- 286/ 16.11.2015г. на Ректора на Университет „Проф.д-р Асен Златаров“ – гр Бургас за член на научно жури и избрана за рецензент на първото му заседание , съгласно протокол №1/ 20.11.2015г.

Тема на дисертационния труд: „Мултиимунофлуоресцентен биосензор за анализ на антибиотици- получаване, характеристики и приложение“

Научна специалност:“Технология на биологично активни вещества /вкл. Ензими, хормони, белтъци“

Научни ръководители : проф.д-тн Цонка Годжевъргова и доц.д-р Катя Габровска

1.Кратки биографични данни и кариерно развитие на кандидата

Докторантката Светла Иванова Стоянова е родена през 1986г. Тя е завършила Университет „Проф. д-р асен Златаров „ – гр. Бургас , със професионална квалификация „инженер – биотехнолог“ ОКС „Бакалавър „ и „Магистър“. През 2012 г е зачислена, като редовен докторант към катедра „Биотехнология“ в същия университет и е отчислена с право на защита през юли 2015г.

2. Анализ на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд съдържа разделите :*Литературен обзор, Цел и задачи, Експериментална част, Резултати и обсъждане, Изводи, Научно-приложни приноси, Литература и Списък на публикациите.* Той е добре

структуриран и балансиран . Половината от изложения материал е посветен на литературния обзор и експерименталната част. В другата половина са представени оригиналните изследвания на докторантката, подкрепени със съответната дискусия и сравнителен анализ.

Литературният анализ е много конкретен, свързан тясно с темата на дисертационния труд. Подробно са разгледани антибиотиците, проникващи в млякото и механизмът на тяхното действие. Едни от най –широко използваните β - лактамни антибиотици са разгледани най-вече от светлината на развитие резистентност към тях от различни бактерии и методите за повишаване на стабилността им, което обаче рефлектира на тяхната активност в млякото. По същия начин са разгледани сулфонамидите и тетрациклините. Много критично е подходено при разглеждането на методите за тяхния анализ, конкретно в млякото. За съжаление у нас се прилагат единствено микробни тестове. Направен е анализ и на останалите стандартни съвременни методи – хроматографски и имунохимични, като са коментирани тяхните преимущества и недостатъци. Вниманието на докторантката главно е насочено към методите на основата на хетерогенен флуоресцентен имуноанализ. Разгледани са всички компоненти на които се основава конструирането на съвременни имуносензори, а именно магнитни наночастици, методите за имобилизация на антитела върху функционализирани частици и тяхното стабилизиране.

Докторантката е показала добра литературна осведоменост и умения критично да анализира резултатите, получени от други изследователски екипи в областта. Това и е позволило въз основа на направените изводи да формулира актуални и точни цели на дисертационния труд.

Две са основните задачи, които са поставени, а именно :“ Разработването на имунофлуоресцентен биосензор за определяне на пеницилини и сулфонамиди на основата на карбоксилни магнитни наночастици“ и „ Разработване на имунофлуоресцентен биосензор за определяне на пеницилини, сулфонамиди и тетрациклини на основата на магнитни частици с amino групи. Във връзка с тях са формулирани и много конкретни подзадачи, които докторантката със завидна последователност по-нататък е изпълнила в своите научни изследвания.

В експерименталната част материалите са представени компактно, а методите са описани кратко и ясно, без излишни подробности. От методична гледна точка са коректни и не будят съмнение.

Представените резултати и тяхното обсъждане бих разделила на две части- получаване на биологичния преобразувател на основата на флуоресцентни конюгати и тяхното пречистване и доказване. Тук причислявам активирането на магнитни наночастици и имобилизация на специфични антитела. Втората част обхваща изследванията свързани с флуоресцентния имуноанализ на антибиотици в моделни разтвори и мляко.

Получаването на конюгати между антигени /в случая антибиотици/ и флуоресцентни багрила е осъществено на един познат метод широко прилаган в имобилизицията на биологичноактивни вещества, а именно карбодиимиден. Тук той оригинално е използван и интерпретиран с представени схеми от докторантката и доказани с абсорбционни спектри. Чистота им е доказана с високоефективна течна хроматография при две дължини на вълните, като резултатите са онагледени подробно с представяне на оригинални хроматограми.

Получаването и активирането на магнитни наночастици е извършено на основата на предишни изследвания от чужди автори, като докторантката е установила в конкретния случай условията на процедурата по отношение на рН и скорост на разбъркване и тяхното влияние върху тяхния диаметър. Това е от съществено значение за формирането на частици с развита повърхност, което е от особена важност за по-нататъшната им химическа модификация и свързването на биологични рецептори. От проведените методи за имобилизация е установено, че значително по-добри са резултатите по отношение на активността на свързаното антитяло чрез прилагане на ориентирувания метод.

Прави добро впечатление илюстрирането на стъпките в имобилизационните методи с подходящи схеми от докторантката.

С получените нови афинитетни биологични системи са проведени редица определения на пеницилин, сулфадиметоксин и тетрациклин. Извършен е единичен и двоен имунофлуоресцентен анализ на пеницилин и сулфадиметоксин на основата на магнитни частички, съдържащи карбоксилни групи. Намерен е правилен ход на изследванията, като първоначално в стандартни разтвори е определено оптималното съотношение между

компонентите на системата. Въз основа на това е изчислен и свързващият капацитет на конюгатите към имобилизираните антитела. Наред с това е определено и влиянието на активирания агент и метода на имобилизация на антителата. Всичко това е добре илюстрирано със схема, описваща стъпките на процедурите.

Направен е сравнителен анализ в буфер и в реален обект мляко по основните параметри на един биоаналитичен метод, а именно: линеен диапазон, корелационни коефициенти, IC50. Тези резултати са дискутирани в рамките и на постиженията на други автори. Доказана е високата чувствителност на анализа с прилагане на ориентирана имобилизация на антитела спрямо двата антибиотика. Също са определени най-важните параметри на метода за съвместно определяне на антибиотиците, което сметам за едно успешно и оригинално постижение на докторантката.

В десертационния труд е представена и възможността за определяне на горните антибиотици плюс тетрациклин на основата на магнитни наночастици, съдържащи аминогрупи. Също тук са извършени поотделни определения на антибиотиците и едновременно определяне на трите вида субстанции. Чрез най-важните параметри на аналитичните методи отново е доказано по-доброто действие на ориентираната имобилизация на антителата.

От съществено значение е изследваната крос-реактивност на анти-тетрациклин антитяло. Резултатите за доксициклин са отрицателни, докато за хлортетрациклин и окситетрациклин са сходни.

Проведен е и сравнителен анализ в буферни разтвори и мляко, като е приложено съвместно определяне на трите антибиотика. Много добре са представени получените резултати в обобщена таблица по отношение на основните параметри на аналитичния метод. Доказано е, че са постигнати по-добри резултати с магнитните частички, съдържащи аминогрупи.

Извършено е и валидиране на тройния анализ по отношение на рН и маслеността на краве мляко. Всъщност това са и най-важните показатели за качеството на млякото. Логични резултати са получени с повишаване на маслеността-чувствителността на тройната система намалява. Интерес представлява и проведеният анализ с тройната система в присъствие на соматични клетки.

Доказана е и високата стабилност на имобилизираните антитела и флуоресцентни конюгати . Те остават стабилни в продължение на две години, което е едно съществено достижение получено от докторантката.

3. Публикационна дейност

Представените публикации във връзка с дисертационния труд напълно отговарят на изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Университет „Проф.д-р Асен Златаров4- гр. Бургас.

Докторантката е представила 6 броя публикации. Две от тях са в известни международни списания с импакт фактор. Три са работите отпечатани в Научни трудове на Русенския университет и една на Научна сесия на Биологическия факултет на СУ.

Представени са и 9 броя цитати от статията публикувана в Analytical Letters. За съжаление три от тях под № 6, 7 и 8 са косвени автоцитати.

Докторантката е участвала в два научни проект към НИХ на Университета по темата на дисертацията. Тя също е била консултант на двама дипломанти. Няма сведения за ръководени от нея занятия, за което докторантката би могла да даде допълнително сведения.

4. Приноси на дисертационния труд

В направените изводи напълно са отразени постигнатите резултати. Това представлява един огромен труд, изпълнен с методична последователности правилно интерпретиран в светлината на достиженията в световната литература и научна практика.

За мен най-съществения научно-приложен принос е успешния дизайн на интелигентна мултиафенитетна система за едновременно определяне на три вида антибиотици.

5. Критични бележки и въпроси.

В експерименталната част не е посочена използваната апаратура и най-вече вида на спектрофлуориметъра. Не открих и точно какъв пеницилин е използван за определенията.

На места се срещат изрази като „стандартна права“ и някои термини , като „аналит“, „сток разтвор“ и др., които съм склонна да приема , като лош превод и технически грешки.

Заглавието е доста амбициозно по отношение на термина „Биосензор“. На практика биосензорът е компактно аналитично устройство , състоящо се от биологичен и електрохимичен, оптичен , акустичен и др. преобразуватели.

Ето защо възниква и следният логичен въпрос:

Как докторантката си представя конструирането и работата на един в случая оптичен биосензор?

б. Лични впечатления.

Не познавам лично докторантката. Но имайки предвид оформянето и подреждането на дисертационния труд и на цялата документация в мен възниква впечатлението за изграждането на един прецизен научен работник и считам , че задачите на образователна и научна степен „Доктор“ са изпълнени.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редовната докторантка Светла Иванова Стоянова и представеният ми за рецензия дисертационен труд напълно отговарят на изисквания на ЗРАС и правилника на Университет „Проф. д-р Асен Златаров“- гр. Бургас.

Убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да гласува положително и на Факултетния съвет при „Факултет по технически науки“ да и присъди образователна и научна степен „Доктор“

19.12.2015

Рецензент:


/проф.д-р инж. Л. Йотова/