

## РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд „Получаване на имунонаноструктуриран биосензор за анализ на прогестерон в млечни продукти“ представен за получаване на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност 02.11.11. “Технология на биологично активни вещества” от **ЦВЕТОМИРА ТОШКОВА ИВАНОВА**

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

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е посветен на един актуален и интересен проблем, отнасящ се разработката на имунонаноструктурирани биосензори за анализ на стероидни съединения в хранителни продукти. Конкретният обект е анализ на прогестерон в млечни продукти – изключително актуален с оглед контрол на безопасността на храните и здравословното хранене. Въпреки че за определяне на концентрацията на прогестерон в серум и мляко са разработени редица имунохимични методи с различни маркери - изотопни, ензимни и флуоресцентни, прилагането на магнитни наночастици като носители за имобилизация на антитела и съчетаването им с ензимно свързан имуносорбентен и имунофлуоресцентен анализ е нова възможност за създаване на чувствителен и бърз метод за определяне на концентрацията на прогестерон директно в пълномаслено мляко. Предимствата на магнитните наночастици осигуряват по-добра чувствителност и бързина на имуноанализа, кратко време за имобилизация на антитялото и прости процедури за измиване и разделяне на магнитните наночастици с имобилизирани антитела и конюгати при провеждане на имуноанализа. Недостатъците на досега разработените имунохимични техники за анализ на прогестерон и предложението в дисертационния труд нов подход 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, а не само преповтарят и потвърждават вече установени зависимости.

Предимствата на различни 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, хормони в храните, както и влиянието на прогестерона в млякото върху човешкото здраве. 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 разработване и охарактеризиране на имуноанализ, за определяне концентрацията на прогестерон в мляко на базата на имобилизирани антитела върху магнитни наночастици, на чийто основа да бъде създаден оптичен биосензор. Следвайки тази цел докторантката е изследвала условията за получаване на модифицирани магнитни наночастици, условията за провеждане на безпорядъчна и ориентирана имобилизация на анти-прогестерон антитялото върху активираните магнитни наночастици. Минава през разработване на ензимно-свързан имуносорбентен анализ на базата на магнитни наночастици (МНЧ-ELISA) за определяне концентрацията на прогестерон в мляко и като финал на една значима работа, разработва флуоресцентен имуноанализ на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на прогестерон в мляко. Като логично следствие е и направеното валидиране на флуоресцентен имуноанализ на основата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на прогестерон в мляко.

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.

Разделът „Материали и методи“ показва разнообразната методична база, използвана при изследванията. Прави впечатление балансираното 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, модифициран ензимно-свързан имуносорбентен анализ за прогестерон в мляко на основата на магнитни наночастици; разработен е бърз, чувствителен, флуоресцентен имуноанализ за прогестерон в мляко на основата на магнитни наночастици. На базата на разработения имунофлуоресцентен метод за прогестерон ще бъде създаден оптичен наноструктурен биосензор, който в момента се разработва и предстои валидирането на апарата. 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, пречистени и доказани нови ензимни и флуоресцентни конюгати на прогестерон.
- Получени са магнитни наночастици с диаметър 182 nm, които са подложени на повърхностна модификация с APTES с цел въвеждане на аминокислотни групи.
- Получени са много добри аналитични параметри на разработената МНЧ-ELISA за определяне концентрацията на прогестерон в мляко: линеен диапазон 0.125 – 5 ng/mL, чувствителност (LOD) - 0.09 ng/mL.
- При сравняване на получените резултати с аналогични резултати получени от други автори е констатирано, че чувствителността на анализа за прогестерон в пълномаслено мляко чрез магнитно-базираната ELISA е по-

висока и времето за анализ по-кратко в сравнение с чувствителността на конвенционалната ELISA.

- Флуоресцентният имуноанализ за определяне концентрацията на прогестерон в мляко на базата на магнитни наночастици има по-добри аналитични характеристики от МНЧ-ELISA: по-широк линеен диапазон; по-висока чувствителност и е по-бърз.
- Доказано е, че най-значимите фактори при валидирането на флуоресцентния имуноанализ за прогестерон са маслеността и броят на соматичните клетки в млякото.

Всички резултати са онагледени добре, което дава възможност на читателя да се ориентира лесно в богатия фактологически материал. Резултатите са представени на 20 фигури и 10 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.

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 научни и 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 две много сериозни издания: *"Analytical letters"* и *"International journal of dairy technplogy"*, което е обективна оценка за качеството на експерименталната работа и важноста на получените резултати за развитието на това научно направление. Докторантката е представила още две публикации в национални издания и има две участия в национални конференции с международно участие. Като основен научен принос може да се открие осъществената за пръв път ковалентна имобилизация изследваните моноклонални антитела върху модифицирани магнитни наночстици и разработката на валидирани, бързи и чувствителни имунохимимични методи за анализ на прогестерон. Докторантката не спира до тук, а дава и насоки за практическото приложение на тези методи, което е принос с научно-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 **ЦВЕТОМИРА ТОШКОВА ИВАНОВА** образователната и научна степен „Доктор“.

04.07.2016

Пловдив

Рецензент: .....

(проф. д-р Алберт Кръстанов)