

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Катя Иванова Габровска, кат. Биотехнология,  
Университет „проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас

относно дисертация на тема: **Разработване на имуноанализи на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на фосфороорганични пестициди в мляко**”,

изготвена от **МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА**, за разкриване на процедура за защита и присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност „Технология на биологично активните вещества (включително ензими, хормони, белтъци)”

### 1. Кратки биографични данни и кариерно развитие на кандидата.

**МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА** е завършила Университет „Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас, специалност Биотехнологии през 2013 г. През 2014 г. е придобила магистърска степен инженер-биотехнолог по програма „Анализ и контрол на храни”, и от същата година е зачислена на редовна докторантура в катедра „Биотехнология” на Университет ”Проф. д-р Ас. Златаров”, Бургас.

### 2. Анализ на дисертационния труд.

Дисертационният труд на Марина Янева е насочен към разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ базиран на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на концентрацията на фосфороорганичните пестициди дихлорвос и параоксон в мляко. Това определя значението и актуалността на темата на дисертацията.

Дисертацията е структурирана и написана по общоприетия начин. Обемът и е 167 страници. Тя съдържа разделите литературен обзор, цел и задачи, експериментална част, резултати и обсъждане, изводи, научно-приложни приноси и литература. Включен е и списък с публикациите по темата, както и участията в научни конференции и научни сесии. Декларация за оригиналност удостоверява истинността на проведените от докторантката експерименти и представените резултати.

Литературният обзор е много конкретен, свързан тясно с темата на дисертационния труд. Оформен е на базата на 232 литературни източника, всички на английски език, а около 70% от тях са публикувани след 2000 г., което показва актуалността на проблема и в международен мащаб. Обзорът съдържа добре структурирана и подредена информация върху разглежданите проблеми, включваща 16 фигури и 1 таблица. Той е в пряка връзка с дисертационната работа и илюстрира информираността и компетентността на докторантката по

темата на дисертацията. В него са изяснени методите за получаване и функционализиране на магнитни наночастици като носители за имобилизация, т.е. модификацията им, както и начините за имобилизация на антитела по тяхната повърхност. Подробно са разгледани методите за получаване, пречистване и доказване на конюгатите между антиген и флуоресцентно багрило. Специално внимание е обърнато на стабилизирането на конюгатите и антителата чрез лиофилизация, на характеристиките на конкурентните и неконкурентните имуноанализи, както и на тяхното приложение за откриване на пестициди.

От прегледа на направения литературен обзор може да се заключи, че за откриване на остатъци от пестициди могат да се използват предимно: високоефективна течна хроматография (HPLC), газова хроматография и имуноензимни тестове, но най-подходящи за тази цел са имуофлуоресцентните методи, при които реакцията между антиген и съответното комплементарно антитяло е много селективна и бърза. Много критично е подходено при разглеждането на хетерогенният флуоресцентен имуноанализ, който се предпочита пред хомогенния, тъй като осигурява по-стабилни тестове, благодарение на имобилизацията на антителата към твърди носители. Вниманието на докторантката е насочено главно към методите за получаване и използването на наночастици като носител за имобилизация на антитела, което е перспективно направление, както и към прилагането на широко специфично антитяло за разработване на мулти-имуноанализи. Получаването на поликлонално антитяло с широка специфичност позволява разработването на мулти-имуноанализ за едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в една и съща проба. От направения литературен преглед се вижда, че в научната литература няма разработени хетерогенни имуофлуоресцентни анализи за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон. Това, по всяка вероятност, насочва научния ръководител към поставянето на този проблем за решаване от докторантката.

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 направеното обобщение на литературния обзор да формулира актуална и точна цел на дисертационния труд. За реализирането и са поставени 6 основни задачи, които са добре формулирани, в логична последователност и целят получаването на хетерогенен имуофлуоресцентен анализ, базиран на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в мляко. Във връзка с това са формулирани и конкретни подзадачи, които докторантката

със завидна последователност по-нататък е изпълнила в своите научни изследвания.

В Експериментална част са описани точно и подробно използваните при изследванията методи: за получаване, пречистване и доказване на необходимите за имуноанализите антители и конюгати; за имобилизация на анти-параоксон и анти-дихлорвос-антителата върху МНЧ; за определяне количеството на имобилизираното върху МНЧ антитяло и оптималните условия за провеждане на имуноанализите; методиките за провеждане на имунофлуоресцентен анализ на базата на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на концентрацията на дихлорвос и параоксон чрез смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон антителя, както и чрез мулти-поликлонално антитяло. Материалите, включени в тази част показват, че в методичен план дисертационният труд е разработен чрез подходящи и правилно подбрани методи за анализ и обработка на резултатите.

В раздела Резултати и обсъждане са представени резултатите по реда на задачите, формулирани във втори раздел. Те са поместени в 11 таблици и на 25 фигури. На първо място са включени изследванията, свързани с получаване и пречистване на имуногените параоксон-BSA, дихлорвос-сBSA, както и тяхното доказване чрез UV-Vis и FTIR анализи. Получените имуногени са използвани за производството на антителя срещу DDVP-BSA и параоксон-BSA, а смес от тях (1:1) за производство на мулти-антитяло. Произведените антители са с висок титър- анти-дихлорвос ( $1:5.2 \times 10^5$ ), анти-параоксон ( $1:4.5 \times 10^5$ ) и мулти-поликлонално ( $1:4.5 \times 10^5$  спрямо конюгат DDVP-сBSA и  $1:3.1 \times 10^3$  спрямо конюгат параоксон-BSA). На базата на получените поликлонални антители и на получен конкурентен конюгат хаптен-OVA е разработен индиректен конкурентен ELISA метод за индивидуално и едновременно определяне концентрацията на параоксон и дихлорвос в краве мляко със следните аналитични характеристики: граница на откриване 0.008 ng/L параоксон; 0.006 ng/L DDVP; линеен интервал от 0.01 до 5 ng/L за двата пестицида. За да се валидират получените резултати от ELISA метода, са проведени експерименти с високоефективна течна хроматография. Установено е, че резултатите от определянето на пестицидите в мляко чрез използване на ELISA и високоефективна течна хроматография са подобни.

Важен компонент на конкурентния имуноанализ са конкуриращите конюгати, получени между дихлорвос и FITC; параоксон и FITC и параоксон и АТТО 620 (за едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в млякото). Конюгатите са получени по механизми представени в дисертацията. Прави добро впечатление илюстрирането на стъпките в методите за получаване на

конюгатите с подходящи реакционни схеми от докторантката. Важен етап е пречистването и потвърждаването на получените конюгати. Първото се постига със силикагел-колонна хроматография, а успешното конюгиране се доказва с UV-спектри при съответната дължина на вълната и чрез FTIR анализи.

Същността на експерименталната работа се състои в създаване на конкурентен имуноанализ на базата на функционализирани МНЧ за индивидуално и едновременно определяне концентрацията на параоксон и дихлорвос в мляко и млечни продукти на основата на получените конюгати. Това е съпроводено с определяне на оптималните условия за имобилизация на анти-дихлорвос, анти-параоксон и мулти-поликлонални антитела върху магнитните наночастици – концентрация на антителата 1 mg/mL и време за имобилизация 2 часа; с определяне на количеството на имобилизираното антитяло при определените оптимални условия за имобилизация е 22.6 µg антитяло/mg магнитни наночастици; с определяне на оптималното съотношение между концентрациите на конюгатите и на съответните имобилизирани антитела. С така определените оптимални концентрации за конюгатите и антителата е проведен имуноанализ за индивидуално определяне концентрацията на параоксон и дихлорвос в краве мляко със следните аналитични характеристики: граница на откриване 1.9 ng/L параоксон; 4.75 ng/L DDVP; линеен интервал 2-300 ng/L параоксон; 5-300 ng/L DDVP.

Проведени са аналогични експерименти за разработването на имуноанализ на базата на МНЧ, за едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в краве мляко с помощта на мултиполиклонално антитяло и конюгати маркирани с различни флуорофори (граница на откриване 3.5 ng/L параоксон; 4 ng/L DDVP; линеен интервал 5-300 ng/L и за двата пестицида) и е доказано, че едновременният имуноанализ за параоксон и DDVP проведен с мулти-поликлоналното антитяло е с по-добра чувствителност в сравнение с резултатите получени при смесването на двете индивидуални имобилизирани антитела в еквивалентни количества. Анализът е приложен за оценка на концентрацията на двата пестицида в буферен разтвор и пастьоризирано краве мляко с ниска концентрация на мазнини – 1%.

Получените резултати от разработения имунофлуоресцентен анализ на параоксон и дихлорвос са сравнени със стойностите, получени от аналогични изследвания с ELISA от други автори. Сравнението е направено само с методи базирани на имуносорбционен ензимен анализ, тъй като в научната литература няма информация за публикации на базата на хетерогенен флуоресцентен имуноанализ. Сравнението показва, че полученият имуноанализ за параоксон и

дихлорвос има по-висока чувствителност, с линейна област изместена към по-ниски концентрации в сравнение с публикуваните резултати от други автори.

Изследвано е и влиянието на различни видове мляко (краве, козе, овче) върху разработения имуноанализ и е установено, че матричният ефект на млякото оказва съществено влияние върху характеристиките на получените имунофлуоресцентни анализи (например при овче мляко границата на откриване е 2 пъти по-висока, а линейният интервал се измества към по-високи концентрации).

Интересно е направеното сравнение по отношение на аналитичните параметри на имунофлуоресцентния и имуноензимен анализ, за анализ на параоксон и дихлорвос в мляко. Резултатите показват, че линейният интервал при имунофлуоресцентния анализ е много по-широк в сравнение с ELISA метода. Това означава, че обхвата на аналитичните измервания е по-голям при имунофлуоресцентния метод. Границата на откриване за изследваните пестициди по ELISA метода е значително по-ниска в сравнение с имунофлуоресцентния метод. Известно е обаче, че лимитните концентрации за дихлорвос и параоксон според Европейското законодателство са съответно 0.015 mg/kg, и 0.01 mg/kg, което показва че имунофлуоресцентният метод може директно да се използва за провеждане на анализи на пестициди, без предварително разреждане, без предварително третиране на пробите мляко. Освен това имунофлуоресцентния метод (30 min) е много по-бърз в сравнение с имуносорбционния ензимен анализ (2h). Друго предимство на имунофлуоресцентния метод е възможността да се осъществят мултианализи – едновременно измерване на няколко пестицида в една и съща проба, както и използването на магнитни наночастици за имобилизация на активния биоагент, чиято голямата специфична повърхност позволява да се постигне по-голяма степен на имобилизация на поликлонално антитяло и оттам по-чувствителен анализ. Затова полученият имунофлуоресцентен конкурентен анализ е интегриран със СД-базирано устройство LACTOSCAN за автоматично определяне на пестициди в мляко

В заключителната част са направени 10 извода, в които са резюмирани резултатите от изследванията по поставените задачи. Те са добре формулирани и произтичат изцяло от експерименталните резултати.

Научните и приложните постижения в докторската дисертация са представени чрез формулираните 3 научно-приложни приноси. Те могат да бъдат отнесени към категорията приноси, чрез които се обогатяват теоретическите и практическите знания в областта, в която са проведени изследванията.

### **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 У-т „Прф. Д-р Асен Златаров”- гр. Бургас

Части от резултатите по дисертационната работа са публикувани в 3 статии, от които две в списание с импакт фактор: Analytical Letters – IF 1.150 и Food and Agricultural Immunology - IF 1.392. Статиите са в съавторство, като във всички Марина Янева е на първо място. Представени са и участия в две научни конференции.

Част от научно-изследователската работа на Марина Янева е свързана с участието и в 2 научно-изследователски проекта по направление „Научна и художествено-творческа дейност” към Университета. Тя също е била консултант на 2 дипломани от специалност „Анализ и контрол на храните“. Водила е и лабораторни упражнения по дисциплината „Приложна ензимология” на студенти от специалност „Биотехнологии” и по дисциплината „Биохимия” на студенти от специалност „Химия”.

Авторефератът е в обем 48 страници и е със структура и съдържание, съответстващи на раздела Резултати и обсъждане от дисертацията.

### **4. Приноси на дисертационния труд.**

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

За мен най-съществения научно-приложен принос е успешното разработване на нов мулти-имунофлуоресцентен метод за едновременно определяне на пестициди на базата на мулти-поликлонално антитяло и различно маркирани конкурентни конюгати.

### **5. Заключение.**

Дисертационната работа на Марина Янева е свързана с решаването на важни проблеми, които стоят пред производители и анализатори при осигуряване на качествени и безопасни храни за потребителите. Тя представлява едно задълбочено изследване на възможностите за създаване на бързи и ефективни методи за анализ и контрол на мляко. В процеса на разработване на дисертацията си докторантката е разширила и задълбочила своите знания в областта на имуноанализа с използване на различни носители, активатори, белязващи агенти и др. Придобила е умения да събира и обработва

научна информация, да планира и извършва експериментална дейност, да анализира и обобщава получените резултати.

По начина на разработване, структура, обем и съдържание, и постигнати научно-приложни приноси представената дисертационна работа отговаря на изискванията за докторска дисертация, което е основание да предложи на Научното жури да оцени положително научния труд и да присъди на **МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА** образователната и научна степен „доктор” по научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъци)”, шифър: 02.11.11.

Януари 2018 г.  
Бургас

Рецензент:.....  
/доц. д-р К. Габровска/