

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор”

Автор на дисертацията: ЗЛАТИНА РУМЕНОВА БЕЧЕВА

Тема на дисертацията: „РАЗРАБОТВАНЕ НА ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН
МИКРОСКОПСКИ МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА СОМАТИЧНИ КЛЕТКИ И НЕУТРОФИЛИ В
МЛЯКО”

Рецензент: проф. д-н Алберт Иванов Кръстанов

Представената ми за рецензия дисертация е посветена на един актуален и изключително интересен проблем, отнасящ се за разработване на имунофлуоресцентни микроскопски анализи с цел определяне на неутрофили и общ брой соматични клетки в краве мляко на базата на антитела срещу неутрофили и неутрофилна еластаза. Избраната тема на дисертацията представлява несъмнен интерес от научна и приложна гледна точка, тъй като не съществува разработен имунофлуоресцентен метод за определяне на соматични клетки на базата на антитяло срещу неутрофилна еластаза. Подходът е ценен, тъй като може да се направи диагностика на мастит в ранна фаза и да се предотвратят значителни икономически загуби. Използването на специфични антитела е най-сигурният метод до момента. Имунологичен тест, на база реакция антитяло–антиген, съчетан с флуоресцентна детекция предлага добра основа за бъдещи анализи на количеството неутрофили и соматични клетки.

Представеният дисертационен труд е с общ обем 157 страници, включващ 11 таблици и 49 фигури и е структуриран както следва: въведение, литературен обзор, цел и задачи, експериментална част с резултати и обсъждане, изводи и списък на използваната литература.

Заглавието отразява лаконично целта и същността на проведените изследвания и точно кореспондира с тематиката на дисертационния труд.

Въведението очертава актуалността и необходимостта от това изследване в светлината на съвременната концепция за здравословен начин на живот и за проследяване здравето и навременното справяне с възникнали инфекции при животни от стопанско значение.

Литературният обзор обхваща 192 литературни източника, от които 2 на кирилица. Преобладаващата част от реферираните източници е от последните 10-15 години, включително и 2016 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.

Общото впечатление от литературния преглед е, че той е всеобхватен и осветлява всички проблеми, касаещи проблемите с мастита при животните, както и влиянието на соматичните клетки върху качествата на млякото и млечните продукти. Подробно са разгледани методите за определяне на общия брой соматични клетки, като особено внимание е обърнато на имунофлуоресцентните микроскопски анализи на соматични клетки в мляко.

Трябва да се отбележи, че за постигане на по-голяма прегледност и съпоставимост, литературните данни по определен важен въпрос са представени са представени таблично и с фигури. Наред с това някои от тях са резюмирани без обсъждане, поради което не проличава отношението на докторантката към тях.

Добрата литературна осведоменост на докторантката, критичното съпоставяне и точната оценка на използваните до момента маститни тестове и дават възможност правилно да обобщи, че те определят общия брой на соматичните клетки в мляко и са подходящи за изследване на изявен мастит. Чрез тях е невъзможно ранното диагностициране на заболяването. Като естествен имунен отговор, количеството на неутрофилите в млякото на кравата драстично се увеличава още от началото на възпалителния процес. Това дава основание на докторантката да насочи вниманието си към разработване на тест за неутрофили и на тяхна база да се прави ранна диагностика на мастит, което естествено води до извода, че разработването на имунофлуоресцентен микроскопски метод за неутрофили с успех може да задоволи необходимостта от бърз и лесен метод с възможност да се адаптира към преносим апарат.

От направения литературен обзор е установено, че не съществува разработен имунофлуоресцентен микроскопски метод за определяне на соматични клетки на базата на антитяло срещу неутрофилна еластаза. Разработването и прилагането на имунофлуоресцентен микроскопски анализ за определяне на неутрофили в краве мляко, на базата на анти-неутрофили антитяло и анти-неутрофилна еластаза антитяло ще осигури бързо и навременно лечение на животното и ще бъдат избегнати големи икономически загуби. Така се обосновава основната задача на дисертационната работа,

а именно разработването на едновременен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на соматични клетки и неутрофили в една и съща проба, което ще позволи да се прави по-точна и категорична диагностика на мастита.

Критичните ми бележки по литературния обзор се отнасят до следното: за по-голяма прегледност и компактност на изложението би било целесъобразно отделните точки в съдържанието чрез разместване да се обединят в основни раздели в зависимост от разглежданата тематика.

В заключение държа да подчертая, че литературният обзор със своята всеобхватност представлява богата информационна база за правилно насочване на изследванията.

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 са и умело използвани много различни по характер методи и техники, свързани както с изолиране, пречистване и доказване на неутрофили от краве мляко и кръв, еластаза от неутрофили, антитела срещу неутрофили и еластаза, флуоресцентни конюгати на получените антитела, така и с изследване на активността, специфичността и стабилността на получените антитела и конюгати, разработване на имунофлуоресцентен микроскопски анализ за определяне на целевите клетки чрез прилагане на конюгатите.

Добрата осведоменост на дисертантката относно предимствата и недостатъците на съществуващите методи я насочва към прецизно изследване на процесите и се стига до изработване на двуцветен имунофлуоресцентен микроскопски анализ за едновременно определяне на общ брой соматични клетки и количество неутрофили в краве мляко.

Едновременно с успешното използване на тези методи са направени някои методични приноси, като най-важният според мен е разработката на имунофлуоресцентен микроскопски анализ за едновременно определяне на общ брой соматични клетки и количество неутрофили в краве мляко. Този принос е едно от основните постижения на дисертацията.

Представеният материал показва, че изпълнението на експерименталната работа е било добра школа за методическата подготовка на дисертантката и в този смисъл е изпълнено предназначението на докторантурата като образователна степен.

Исключително разнообразна и добре усвоена методична база. Избраната методика на изследване напълно съответства на поставената цел и задачи на дисертационния труд.

Експерименталната част на дисертацията е подчинена на поставената крайна цел – разработване на имунофлуоресцентен микроскопски метод за определяне на общ брой соматични клетки в краве мляко и определяне на количеството на неутрофилните клетки от тях.

За тази цел се решават три основни проблема, първият от които се отнася до изолиране на неутрофили и неутрофилна еластаза. Вторият проблем е свързан с получаването на поликлонални антитела и определяне на тяхната чувствителност и активност. Третият проблем касае разработката на самите имунофлуоресцентни анализи

"Резултати и обсъждане" е доминираща част от дисертацията, която е оформена в раздели в зависимост от конкретните изследвания. В тази част се открояват няколко по-важни научни и научно-приложни приноси:

- Изолирани са неутрофили от кръв и мляко на крава чрез използване на водоразтворими полимери, както и неутрофилна еластаза.
- Получени са овчи поликлонални антитела срещу неутрофили и неутрофилна еластаза на крава с висок серумен титър и е доказана тяхната активност спрямо съответно, неутрофили и неутрофилна еластаза.
- Получени са и пречистени конюгати на антителата (анти-неутрофил антитяло и анти-еластаза антитяло) с флуорохроми.
- Разработени са имунофлуоресцентни микроскопски анализи с получените конюгати за определяне на неутрофили при различни количества соматични клетки в краве мляко

Въз основа на прецизно проведените изследвания и критичното съпоставяне на получените резултати е разработен и представен нов, оригинален имунофлуоресцентен микроскопски анализ за едновременно определяне на общ брой соматични клетки и количество неутрофили в краве мляко.

В заключение е направено сравнение на имунофлуоресцентните микроскопски анализи с анти-неутрофил антитяло и анти-еластаза антитяло. Доказано е, че имунофлуоресцентните микроскопски анализи на кръвни клетки с получените флуоресцентно белязани антителата са селективни - оцветяват се само неутрофилите и не се отчита крос-реактивност с мононуклеарните клетки. Така разработените от

докторантката методи предлагат много добра алтернатива, тъй като получените резултати са сравними с вече използваните и разработени методи от други автори.

След успешното решаване на този проблем по-нататък се предлага разработените от докторантката имунофлуоресцентни методи да бъдат приложени към произвеждания от фирма Милкотроник брояч на клетки Lactoscan SCC, който е преносим и лесно се обслужва. За провеждане на непрекъснат анализ и контрол на соматични клетки в мляко са необходими преносими прости апарати с лесно обслужване и ниска цена. Такива възможности може да осигури имунофлуоресцентния микроскопски метод, който лесно може да бъде съчетан с портативен флуоресцентен цитометър.

Приносите на дисертационния труд (основно научно-приложни и методични) 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 и имунологията.

Всички резултати са онагледени и описани много добре, което дава възможност на читателя да се ориентира лесно в богатия фактологически материал. В някои от случаите липсва задълбочена дискусия, която да открие постигнатите от автора резултати и научно-приложни приноси. В тази връзка все пак е положително, че разделът „Резултати и дискусия” завършва със заключение, където да се акцентира върху логическата връзка на проведените изследвания в светлината на постигнатите до този момент резултати и приносите на представения труд. Това дава възможност изводите да звучат още по-убедително, наистина като изводи на базата на получените резултати, а не като кратко резюме на тези резултати.

Като цяло дисертационният труд представлява добре обосновано, комплексно и завършено научно изследване със значими научно-приложни приноси. Разработеният проблем е актуален, но изпълнението му е сложно и изисква комплексни познания както в областта на биологията, така и в областта на ензимната химия, имунология и инструментални техники.

Дисертацията е добре построена методично, изпълнена е прецизно на високо ниво с използване на разнообразни методи и с добре обработени и коректно представени резултати. Изпълнението се отличава с ясен и терминологично точен език.

Във връзка с дисертацията са публикувани 5 научни съобщения, от които две в авторитетните журнали *“Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology”* (Impact factor: 1.06) и *“Food and Agricultural Immunology”* (Impact factor: 1.392). Резултатите са

докладвани на три международни конференции в България и Румъния, които отразяват същността на работата по дисертацията и подчертават самостоятелността на автора по отношение на разработката.

Авторефератът на представения труд отразява напълно основните резултати и приноси на дисертацията и съответства на изискванията за изготвянето му.

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

30.12.2017

Пловдив

Рецензент:

(проф. д-н Алберт Кръстанов)