

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Ангел Иванов Ангелов

на дисертационния труд на инж. Искра Иванова Стойкова
“Биоаналитични методи за определяне на пестициди в матрици от черен дроб”, представен за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** по научна специалност **5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества)**

Дисертационният труд на инж. Искра Иванова Стойкова ***“Биоаналитични методи за определяне на пестициди в матрици от черен дроб”***, представен за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** е разработен в Катедра “Биотехнология” на ХТМУ, София и в отдел „Замърсители от околната среда“ на Централна лаборатория по ветеринарно-санитарна експертиза и екология, София под научното ръководство на доц. д-р инж. Данчо Даналев. Определен съм за член на научното жури със заповед на Ректора на ХТМУ №Р-ОХ-412/18.10.2016 г, а на първото заседание на научното жури съм одобрен за рецензент на дисертацията с протокол №1-44-1/19.10.2016 г.

Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Инженер Искра Стойкова е родена на 23.07.1987 г. От 2006 до 2010 г. е редовен студент в Химикотехнологичен и металургичен университет, София, където получава ОКС „Бакалавър“ по Биотехнологии. Продължава образованието си в ХТМУ и през 2012 г. завършва магистратура по Биотехнологии. В същото време през 2010 г. постъпва на работа като главен експерт в Централна Лаборатория по Ветеринарно-санитарна Експертиза и Екология към БАБХ. От месец март 2013 г. е зачислена като редовен докторант към катедра „Биотехнология“ на ХТМУ под ръководството на доц. д-р инж. Данчо Даналев.

Научни интереси на докторантката са насочени към разработването на нови методи за анализ на биоактивни компоненти в храни и по-специално чрез използване на газова и високоефективна течна хроматография. В контекста на нейните интереси е и избраната тема за разработване на дисертационен труд, която покрива интересите на докторантката и нуждите на бизнеса в лицето на лабораторията, в която докторантката работи.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Замърсяването на хранителните суровини и продукти с химични замърсители, в това число пестициди е световен проблем и неслучайно Световната Здравна Организация полага огромни усилия за преодоляването му. Пестицидите придобиват глобален характер днес поради големите икономически и здравни поражения, които нанасят на хората, животните и околната среда. Значимостта на проблема нараства и поради трудностите за неговото разрешаване. Съвременните методи за анализ и контрол на храни, замърсявания, лекарствени препарати и др. търпят бурни темпове на развитие през последните години с откриването на нови мощни аналитични устройства и детектори като масспектрометрията, ултраефективната течна хроматография и др. Те позволяват анализа вече дори на фемо- и атограми от вещества. Биосензорите представляват аналитични устройства, които са намерили широко приложение в практиката за детекция на токсични замърсители в различни матрици, както и в диагностиката, за детекция на различни фармацевтични продукти и биоактивни компоненти. Тяхната лесна преносимост, сравнително лесният начин на употреба и бързият отговор при детекция на целевите аналити са ги превърнали в част от съвременните техники за детекция и анализ на биомолекули. В този глобален контекст направлението избрано от докторантката и нейният научен ръководител е изключително модерно, актуално и тясно свързано с практиката и нейните нужди от нови, бързи и надеждни техники за анализ и детекция на аналити в различни матрици.

Представената ми за рецензия дисертация е написана на 153 стандартни страници. Нейната структура обхваща разделите: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 32 стр., Изводи от литературният обзор – 1 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и Методи – 18 стр., Резултати и Дискусия – 61 стр., Изводи – 1 стр., Приноси на дисертационния труд – 1 стр., Използвана литература – 15 стр. и научни публикации и участия в конференции и проекти.

Трудът е насочен към разработване на биоаналитични методи в това число биосензор за детекция на токсични замърсители в матрици от животински произход и референтен метод чрез ВЕТХ с флуоресцентна детекция и напълно отговаря на научното направление претендирано от докторантката „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”.

В Литературният обзор на дисертацията последователно се разглеждат и анализират научни публикации относно:

- Европейското законодателство, свързано с проблема със съдържанието на пестициди в храни от животински произход;
- Класификацията, токсикологията и принципа на действие на пестицидите, обект на изследване в дисертационния труд;
- Ацетилхолинестеразата, като ензим в човешкият организъм пряко засегнат от наличието на пестициди в храните;
- Видовете пестициди повлияващи дейността на ацетилхолинестеразата;
- Съвременните аналитични техники използвани за анализ на пестициди и специфичната пробоподготовка на матрици от животински произход като част от аналитичния процес;
- Биосензорите като надеждна съвременна техника за анализ и контрол;
- Методи за имобилизация на ензими в контекста на разработката.

Цитираната литература в своята цялост обхваща литературни източници след 2005 година, което несъмнено е доказателство за актуалността на разработваната тематика. Много добро впечатление прави извеждането на Изводи от направения литературен обзор, които дават основание и насоки за много точно и коректно формулиране на целите и задачите, които докторантката си поставя в своя дисертационен труд.

На основата на направения литературен обзор е поставена и целта на дисертационната разработка: разработване и валидиране на аналитичен метод за определяне на пестициди в хранителни матрици от животински произход чрез оптичен биосензор. Така формулирана целта е ясна и точна, с насоченост към продукти от животински произход предлагани на българския пазар, което я прави актуална и за българските потребители. Произтичащите от тази цел задачи са добре определени, ясни и насочени към доказване на поставената цел на изследването.

В раздела “Материали и методи” подробно са описани всички използвани реактиви и приложени техники за синтез на необходимите за имобилизация на целевият ензим матрици, охарактеризиране на получените матрици, имобилизация на ензимите (пероксидаза, холиноксидаза и ацетилхолинестераза) върху матриците за създаване на целевия биосензор, определяне на кинетичните параметри на свободните и

имобилизирани ензими и условията и апаратурата за BETX необходима за създаване на референтният метод.

Разделът “Резултати и дискусия” е основен за дисертацията. Той обхваща около 60 страници, богато е илюстриран с таблици и фигури. Инж. Стойкова с голяма прецизност и аналитичен подход е отразила извършения от нея експериментален труд. Началото на раздела е отделено на големият по обем работа свързан с намирането на подходяща техника за подготовка на пробите като са направени експерименти върху матрици от яйца и черен дроб. Прави добро впечатление, че докторантката прилага най-съвременните техники разработени в областта на пробоподготовката каквито са твърдофазната екстракция и QuEChERS метод. Експериментирани са и няколко системи от различни разтворители. На база на получените от експериментите резултати докторантката мотивирано продължава своите усилия за по-нататъчна работа върху матрицата от черен дроб. Получените резултати от тези експерименти са представени чрез фигури и са обобщени в таблици, което несъмнено спомага за по-лесното им проследяване. В настоящата работа за потвърдителен метод при анализа на карбамати е използвана HPLC-FL със следколонна дериватизация, а останалите пестициди са анализирани чрез GC-MS/MS с йон-улавяща детекция. Валидирането на методите е направено на три концентрационни нива, което напълно съвпада с изискванията на европейските стандарти за работа и на използваният в дисертацията като референт документ SANTE 11945/2015, който е разработен съобразно стандарт ISO 17025:2005. Представените реални хроматограми и таблични данни показват отлична корелация и валидиране на референтните методи.

Втората част от раздела продължава с описание на получаването на нови матрици по зол-гел метод, за нуждите на създаването на целевият биосензор. Синтезирани и използвани са две хибридни матрици на основата на целулозенацетатбутират CAB/APTES и целулозенацетатпропионат CAP/MTES/PAMAM, с вмъкване в тях на дендримери. Получените мембрани имат отлични свойства и способност за имобилизация на целевите ензими. Определени са кинетичните параметри както на свободните, така и на имобилизираните ензими и е направено сравнение между тях под формата на графики, схеми и таблици.

Последната част от дисертационния труд е свързана със създаването на нов оптичен биосензор за детекция на карбамати (алдикарб, метомил, пропоксур и карбофуран) и фосфорорганични пестициди (диазинон, пиримифос-метил, паратион и хлорпирифос-метил) в матрица черен дроб.

Определени са всички параметри на новоконструираният биосензор - време на живот, линеен диапазон, аналитичен добив, повторяемост и др. Разработен е метод за възстановяване на целевия за биосензора ензим. Отлично впечатление прави, че на базата на сравнителен анализ докторантката е направила оценка на икономическата себестойност на новоконструираният биосензор в сравнение с наличните лабораторни техники.

Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Авторефератът на дисертационния труд напълно отговаря на изискванията на чл.11, т.5 от ППНСЗД на ХТМУ, като обхваща изцяло следните раздели от дисертационния труд Използвани съкращения, Въведение, Цел и задачи, Резултати и Дискусия, Изводи, Приноси и Списък с публикациите и участията в научни форуми на докторанта по темата на дисертацията.

Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Считам, че работата по настоящия дисертационен труд е довела до следните по-значими приноси :

1. За нуждите на проведените анализи на пестициди е разработена методика за пробоподготовка, като са тествани различни условия и методи и е направена оптимизация;
2. Разработен е референтен метод за определяне на N-метил карбамати в матрица от черен дроб чрез BETX с флуоресцентна детекция;
3. Разработен е аналитичен метод за определяне на фосфорорганични съединения в матрица черен дроб чрез GC-MS/MS;
4. Синтезирани са нови хибридни мембрани по зол-гелен метод за нуждата на конструирането на биосензора.
5. Конструиран е оптичен биосензор с имобилизирана AChE за определяне на пестициди, който е доказано, че е приложим и за други инхибитори на AChE с непестицидна структура. Методът е валидиран съгласно изискванията на нормативните документи.

Мнение за публикациите на докторанта по темата на дисертационния труд

Към момента на представянето на дисертационния труд, част от резултатите са оформени в 3 научни публикации, от които двете са в списание с импакт фактор и една в *Annuaire de l'Université de Sofia* "St.

Kliment Ohridski" Faculte de Biologie. Посочените работи напълно удовлетворяват изискванията на чл. 11 т. 4 от ППНСЗД на ХТМУ за защита на дисертация.

Критични бележки и коментари

1. Структурата и последователността на текста в раздел „Материали и методи“ е добре да се запази и при текста в „Резултати и дискусия“. „Материали и методи“ започва с описание на получаване на мембрани, методи за имобилизация и т.н., а „Резултати и дискусия“ с оптимизиране на пробоподготовка, валидиране на методи и т.н.
2. В табл. 10 не е посочена измерителна единица за показателя Време на задържане.
3. На стр. 95 се представя Избор на методика, което не е реален резултат от експериментална работа и може би мястото на този текст е в раздел „Материали и методи“.

Заклучение

Направените забележки в никаква степен не намаляват общото впечатление за значителна по обем извършена експериментална работа. Дисертационния труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които са оригинални по своя характер. Докторантката Искра Стойкова изпълнява напълно формалните критерии на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешния Правилник на ХТМУ, София за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“.

Това ми дава основание да изразя становище, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията, посочени в Закона за развитие на академичния състав в РБългария и с убеденост давам положителна оценка на Искра Иванова Стойкова и гласувам за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" на инж. Искра Стойкова.

Пловдив, 25.11.2014 г

Проф. д-р Ангел Иванов Ангелов