

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.1 „Физични науки”, специалност „Електрични, магнитни и оптични свойства на кондензираната материя”

Автор на дисертационния труд: **Евдокия Белина** от Институт по оптически материали и технологии „Акад. Й. Малиновски”, Българска академия на науките.

Тема на дисертационния труд: **“Биосензори, базирани на повърхнинен плазмонен резонанс в дифракционни решетки с директна имобилизация на разпознаващото вещество”**.

Изготвил: **проф. д.ф.н. Лъчезар Аврамов**, доктор на физическите науки, професор в Институт по електроника “Акад. Емил Джаков”, Българска академия на науките, 1784 София, бул. „Цариградско шосе” 72, определен за член на Научно жури със заповед № РД-15-358 от 30.07.2020 г. на Директора на ИОМТ

1. Актуалност на разработвания проблем в научно и научноприложно отношение

Въпреки, че лазерите вече са навлезли широко в изследователската дейност и медицинската практика, физичните ефекти на взаимодействие на светлината с биологичните структури представляват актуален изследователски проблем, поради възможността, която дават за развитие на ранна и прецизна диагностика и индивидуализирана медицина. Полученото ново научно знание е от значение, както за разработка на нови диагностични и терапевтични методи, така и за създаване на нова апаратура.

Научното поле на дисертационния труд може да бъде определено като отнасящо се към фотониката, в разбирането ѝ за наука изследваща създаването, управлението и приложението на светлинни кванти. Фотониката е призната за едно от най-актуалните направления в съвременната наука, за „мостов” подход между многобройни научни и технологични сфери, с огромен потенциал за създаване и изследване на нови материали, устройства и методи. В този план тематиката е подчертано мултидисциплинарна, което изисква добра научна подготовка и широк поглед върху няколко научни области.

Дисертацията е продължение на традиционно утвърдена тематика в Института по електроника "Акад. Емил Джаков" - разработката и приложението на специализирана електронна и лазерна апаратура и методи за биомедицината.

2. Научна компетентност на докторанта

В глава I на дисертационния труд е представен задълбочен литературен обзор на проблематиката, който показва, че докторантът е навлязъл професионално в тематиката и е основа за ясна постановка на изследователските задачи.

Анализирани са основните характеристики, определящи видовете биосензори и са описани техните предимства и недостатъци. Разгледано е явлението повърхнинен плазмонен резонанс и условията за неговото възникване. Дефинирани са методите за възбуждане на ППР, както и използваните за целта техники. Направено е описание на биосензорите, базирани на ППР, техните предимства и ограничения. Оценена е ефективността от използваните методи, с което е изложена необходимостта от нов подход за имобилизация на биоразпознаващи елементи. Обобщени са използваните до момента методи за получаване на силен сигнал от специфичната реакция, чрез оптимизиране на биоразпознаващия елемент. Представени са методите за реализация на опорен канал за отчитане на сигнала от неспецифични реакции.

На основата на адекватни изводи от литературния обзор са поставени задачите на дисертацията и е формулирана основната цел – разработване на лабораторен прототип на ППР биосензор за достигане на максимална специфичност и са определени основните задачи: Разработка на метод за директна имобилизация на разпознаващото вещество и създаване на биочип, базиран на ППР върху позлатена дифракционна решетка. Изследване на функционалността на отложените разпознаващи слоеве за биодетекция, теоретичен анализ на метод за възбуждане на двоен ППР чрез хирален анизотропен слой за разпознаване на сигналите от специфични/неспецифични въздействия. Потвърждаване на теоретичните изводи чрез моделни експерименти.

3. Адекватност на научната методика по отношение на поставените цели и задачи

Представени са металопротеините, които са доказано високо чувствителни молекули, тъй като тяхната биоактивност се определя не само от химическата им структура, но и от конформационните промени, настъпващи при имобилизационните процеси. Използван е

подход за осъществяване на имобилизация на веществата, избрани за биоразпознаване, хемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb), осигуряващ запазването на тяхната химическа и физическа структура и тяхната биоактивност. Чрез избрания подход се осигурява добра адхезия между отложените молекули и повърхността на чипа, което елиминира необходимостта от използване на вграждаща матрица. По този начин, чрез директна имобилизация се елиминират отрицателните въздействия на вграждащата матрица върху чувствителността и специфичността на биосензора. Постигната е рекордна чувствителност при детекция на глюкоза.

Няма информация този метод да е използван за отлагане на металопротеини, като хемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb), въпреки тяхното широко приложение в сензорните устройства. Избраните технически средства са подходящи за реализация на методите и е доказано убедително, че методическият подход е адекватен за решаване на поставените експериментални задачи.

4. Аналитична характеристика на естеството и достоверността на експерименталните резултати

В дисертационния труд е избран методът MAPLE, осигуряващ запазването на химическата и физическата структура, както и биоактивността на металопротеините, която зависи от конформационните промени, които настъпват при имобилизационните процеси.

Имобилизацията на органични материали и в частност на протеини представлява голямо предизвикателство в развитието на биосензорни устройства, поради тяхната триизмерна структура. Подходът осигурява добра адхезия между отложените молекули и повърхността на чипа, което елиминира необходимостта от използване на вграждаща матрица. Директната имобилизация по този начин елиминира отрицателните въздействия на вграждащата матрица върху чувствителността и специфичността на биосензора.

В резултат е постигната рекордна чувствителност при детекция на глюкоза. Ефективността на метода за имобилизация е анализирана допълнително чрез изследване на морфологията на получените слоеве чрез трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Показано е, че процесът на имобилизация може да протече без значително разрушаване на металопротеините, чрез прецизна оптимизация на MAPLE параметрите. Въпреки че FTIR спектрите показват известно изкривяване на протеиновите молекули в отложените слоеве, те притежават биоактивност, подходяща за сензорни приложения.

Показаните резултати са доказателство, че MAPLE техниката предоставя уникални възможности за директна имобилизация, не само благодарение на способността да се запази биоактивността на отложените молекули, но и защото осигурява добра адхезия между тях и повърхността на чипа.

Достоверността на представените резултати не предизвиква съмнение.

5. Научни и научно-приложни приноси

Основните научни новости на дисертационния труд са представени в Глави 2 и 3.

Чрез разработената структура - позлатена дифракционна решетка, с имобилизиран Hb – слой с дебелина 120 nm и проточна клетка е създаден прототип на ППР биосензор. Демонстрирана е регистрацията на глюкоза чрез отчитане на нейната концентрация. Използвано е съединението „гликиран хемоглобин“, което по данни от литературата не е използвано досега за детекция на глюкоза. Показано е отместване от 5 – 7 nm при глюкозни концентрации 5 – 7 mmol/L, отговарящи на физическите концентрации в кръвта е доказателство за чувствителността и обхвата на детекция на устройството.

На базата на MAPLE технологията, за първи път е създаден метод за директна имобилизация на металопротеини, като са оптимизирани технологичните параметри, при които отложените слоеве са биоактивни. Чрез изследване на реакциите на свързване на различните функционални групи на металопротеините Hb и Mb е доказана биоактивността на отложените слоеве. Експериментално е доказана високата чувствителност, която се постига като следствие на директната имобилизация при детекция на глюкоза в реално време в лабораторни условия. За първи път е осъществена регистрацията на глюкоза чрез хемоглобин. Теоретично е показано, че чрез хирална анизотропна структура могат да бъдат възбудени дновременно два плазмонни резонанса в дифракционна решетка, които са спектрално разделени.

Чрез директна имобилизация на Hb върху дълга периодична решетка в оптично влакно в създаден биосензор за глюкоза. Детектирани са рекордно ниски концентрации на глюкоза в човешката слюнка.

В заключение бих отбелязал, че получените резултати имат съществено значение, което разкрива перспектива за неинвазивни измервания на концентрация на кръвна захар – един изключително важен медицински проблем, с високо социално значение.

6. Оценка на личния принос на докторанта

Докторантката е представила основните приноси на стр. 77 на дисертацията, като не е формулирала оценка на собствените си приноси.

Текстът на самия дисертационен труд обаче, прегледът на състава на научния колектив, акцентите в заглавията и други признаци на организация и изпълнение на изследователските дейности не дават основание личният ѝ принос да бъде поставен под съмнение. Обектът на научното изследване е мултидисциплинарен и получаване на краен резултат не е възможен без участие на специалисти с различен научен профил. Все пак, може да се обобщи, че основният принос на докторанта се състои в разработката на биочип, базиран на ППР в дифракционна решетка, чрез директна имобилизация на Nb и Mb, както и в експериментално доказаната възможност за възбуждане на двоен плазмонен резонанс в дифракционни решетки чрез моделни експерименти с отложени слоеве с кръгово поляризирана полихроматична светлина.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Количеството и качеството на публикациите, отразяващи получените научни резултати покриват изискванията за докторска дисертация. Както справедливо е отбелязано обаче в "Изводи" на Глава 2, FTIR спектрите и ТЕМ изследванията на имобилизираното вещество показват, че е необходимо допълнително усъвършенстване на технологията.

Общото ми впечатление е, че докторантурата е допринесла за изграждането на един висококвалифициран и мотивиран млад учен.

8. Съответствие на автореферата

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и вярно отразява основните резултати от дисертацията. Структурата и наименованията на отделните раздели и подраздели в автореферата основно възпроизвеждат структурата и наименованията на дисертационния труд.

9. Заключение

Дисертацията и наукометричните ѝ показатели отговорят на изискванията на ЗРАС в РБ и Правилника за неговото приложение за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“.

Считам, че основната цел на изследванията е постигната, поставените задачи са изпълнени и представеният дисертационен труд има много добър вид. Отчитайки качеството на дисертационния труд и значимостта на получените в него резултати, препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на Евдокия Беалина образователната и научна степен „доктор”.

София

28.09.2020 г.

Изготвил:

(проф. д.ф.н Лъчезар Аврамов)