

Рецензия

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“

Автор на дисертационния труд: Евдокия Огнянова Белина, докторант в Институт по оптически материали и технологии „Акад. Йордан Малиновски“, Българска академия на науките.

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

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.1 Физични науки, научна специалност „Електрични, магнитни и оптични свойства на кондензираната материя“

Рецензент: доц. д-р Димана Назърова, Институт по оптически материали и технологии „Акад. Йордан Малиновски“, Българска академия на науките, Научно жури, определено със заповед № РД-15-358/30.07.2020г.

1. Актуалност на разработвания дисертационен труд

В представения за рецензиране дисертационен труд е поставена цел: разработване на лабораторен прототип на повърхнинно плазмонен резонансен (ППР) биосензор с достигане на максимална специфичност на сензора, което всъщност е решаване на основния проблем при биосензорите на този принцип. Дисертационният труд има приложна насоченост, като е пряко обвързан с приоритетното направление „Подобряване на качеството на живот“ в Националната стратегия за развитие на научните изследвания в Република България 2017-2030 г. Решаваните в дисертацията задачи напълно отговарят на стратегическата цел на научните изследвания в България за изграждане на икономика, базирана на знанието и иновациите. Темата на дисертацията е изключително актуална, поради решаването на основния проблем на биосензорите, базирани на явлението повърхнинен плазмонен резонанс (ППР) - недостатъчната специфичност. Този основен недостатък пречи на сензорите от този тип да получат приложение като полеви устройства на място. От друга страна тези сензори предлагат изключително чувствителен, точен и количествен метод за регистрация на молекулярни реакции в реално време. Това ги прави много атрактивни за извършване както на ранна диагностика, така и за проследяване на ефективността от дадено лечение. Регистрацията и наблюдението в реално време на биологичните или биохимичните процеси е от изключително значение за медицината и биологията. За постигането на прецизни диагнози и преминаване към индивидуална за всеки пациент медицина е необходимо разработването на високочувствителни, специфични и рентабилни биосензори. Необходимостта от достъпни, неинвазивни тестове и контрол на ефективността на лечение дават тласък в развитието на биосензорите. Текущата епидемиологична обстановка силно потвърждава необходимостта от изследвания за разработване на тестове за диагностика и контрол. Изследванията в тази област са с висока интензивност, което се потвърждава от експоненциално нарастващият брой на публикациите в нея.

За постигане на целите на дисертацията са изпълнени пет задачи, които могат да се опишат като: разработване на метод за директна имобилизация на разпознаващото вещество; разработване на биочип, базиран на ППР, като се използват тези слоеве; изследване функционалността на така отложените разпознаващи слоеве; провеждане на теоретичен анализ на метод за възбуждане на двоен ППР и експериментално потвърждаване на теоретичните изводи. С увереност може да се каже, че резултатите от изпълнението на тези задачи ще намерят приложение в практиката.

2. Познаване на състоянието на проблема и анализ на литературните данни

Представеният дисертационен труд се състои от 96 страници, 51 фигури, 2 таблици и 119 литературни източника. Трябва да се отбележи, че голяма част от фигурите включват няколко отделни фигури. Дисертацията съдържа увод, три глави и описание на приносите.

Глава 1 представлява обширен литературен обзор, оформен в пет отделни части и 36 страници. В първата част накратко се разглеждат биосензорите - видове и сравнителни характеристики. Втората част е посветена на повърхнинните плазмони, като са описани свойствата на повърхнинните вълни, дисперсионното уравнение, което характеризира разпространението на електромагнитните вълни на границата между две среди (метал и диелектрик), явлението повърхнинен плазмонен резонанс и специфичните условия и схеми за възбуждането му. В третата си част литературният обзор разглежда ППР биосензорите и определя основните фактори, ограничаващи характеристиките им. Четвъртата най-обширна част от обзора е посветена на оптимизирането на разпознаващия слой. Разгледани са внимателно прилаганите от други автори методи и решения. Обобщени са съществуващите различни химически и физически методи за отлагане на тънки слоеве и са определени, кои от тях са подходящи за имобилизацията на биологични вещества. Разгледани са подробно химическите и физическите методи за имобилизация. Последната пета част на първа глава е посветена на методите за разпознаване на сигналите от взаимодействията, които са: метод, използващ пространственото разположение на сигналния и опорен канал и метод, чрез осъществяване на двувълнов повърхнинен плазмонен резонанс.

Прегледът на литературните данни е много обширен, като са включени източници от 1968 г. до настоящия момент. Определено прави впечатление аналитичният подход при обсъждането на резултатите, получени от други автори, което свидетелства за много добро познаване на принципите на действие на ППР биосензорите.

3. Методика на изследване

Във втората глава на дисертацията, озаглавена „Стратегия за получаване на силен сигнал от специфичната реакция, чрез оптимизация на биоразпознаващия слой“ е показан подход за осъществяване на имобилизация чрез MAPLE, с набор от конкретни параметри за отлагане на металлопротеини, осигуряващи запазването на тяхната химическа и физическа структура, както и тяхната биоактивност. Чрез показания подход се 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. Имобилизацията на органични материали и в частност на протеини представлява голямо предизвикателство в развитието на биосензорни устройства, поради тяхната триизмерна структура. Конформационните изменения на протеините, които зависят от агрегацията по време на отлагането, често водят до промени в тяхната биологична активност. Докладваните резултати показват ефективността на тази техника. В третата глава на дисертацията, озаглавена „Създаване на опорен канал за разпознаване/разделяне на сигналите от специфични/неспецифични взаимодействия“ се представят кратко оптичните свойства на идеален Холестеричен Течно-Кристален Слой (ХТКС), изследват се собствените стойности на собствените моди на разпространение на базата на решението на вълновото уравнение за такава среда, дефинират се различни режими на разпространение и теоретично се изследва възможността за възбуждане на ППР чрез дифракционна решетка. Втората част на тази глава се отнася до експериментално изследване на позлатена дифракционна решетка, в която ППР се детектира спектрално. Разгледани са два режима на възбуждане на ППР и са оценени възможностите за приложение в биосензорите.

Методиката на изследването включва провеждането на прецизни експерименти за получаване чрез MAPLE наноструктурирани слоеве, изследвани чрез явлението ППР. За тази цел е използвана позлатена дифракционна решетка в ролята на преобразовател. Използван е атомно-силов микроскоп (AFM) за анализ на повърхността на дифракционната решетка с директно имобилизиран слой. Успешното прилагане на тази методика за постигане на поставената в дисертацията цел изисква голям обем експериментална дейност. С увереност може да се каже, че е проведена значителна експериментална работа. Аз лично съм била свидетел на упорития и продължителен труд, вложен от докторантката Евдокия Белина през времетраенето на нейната докторантура. За установяване на запазването на протеините в остатъчната мишена е използвана Фурие трансформирана инфрачервена спектроскопия (FTIR). Резултатите, показват, че отлагането при оптималните параметри на MAPLE протеините в остатъчната мишена са запазени. За определяне на морфологията на слоевете е използвана трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Сравнението на ефективността на възбуждане на ППР в слоевете, отложени по различни методики, е направено чрез изследване на спектрите на пропускане и отражение. Изследвани са и абсорбционните спектри на различни използвани багрила.

Използваната методика в настоящия дисертационен труд е обширна, но въпреки големия обхват в изложението е показано добро разбиране и владение на методите за изследване.

4. Кратка аналитична характеристика на получените резултати

Резултатите от проведените изследвания в дисертационния труд са представени в Глави 2 и 3. Всяка глава завършва с ясно формулирани изводи от изследването в тази глава.

Във втора глава е показано, че процесът на имобилизация може да протече без значително разрушаване на металопротеините, чрез прецизна оптимизация на MAPLE параметрите. Докторант Евдокия Белина изследва биоактивността на отложените с MAPLE слоеве и установява, че те са подходящи за сензорни приложения, въпреки че тази активност до момента е по-ниска от активността на слоевете, отложени чрез центрофужно поливане, които от своя страна са лесно разтворими и нямат практическо приложение. Показаните резултати

са доказателство, че MAPLE техниката предоставя уникални възможности за директна имобилизация. Това е така поради два факта: 1) способността да се запази биоактивността на отложените молекули и 2) осигуряването на добра адхезия между тези молекули и повърхността на чипа. Установения подход и параметри на MAPLE без вграждаща матрица е демонстрирано чрез детекция на глюкоза. Създаден е прототип на ППР биосензор чрез имобилизация на хемоглобин и миоглобин върху позлатена дифракционна решетка. Експериментално е доказана високата чувствителност, която се постига като следствие на директната имобилизация при детекция на глюкоза в реално време в лабораторни условия. Осъществена е регистрация на глюкоза чрез хемоглобин.

Друг резултат в тази глава е че чрез директна имобилизация на хемоглобин върху дълга периодична решетка в оптично влакно е създаден биосензор за глюкоза. Детектирани са рекордно ниски концентрации на глюкоза в човешката слюнка, което разкрива перспектива за неинвазивни измервания на концентрация на кръвна захар.

Резултатите в трета глава са също впечатляващи. Направен е теоретичен анализ на възможните реализации на опорен канал за разпознаване на сигналите от специфични взаимодействия - две плазмонни вълни да се възбудят от обикновената и необикновената вълни, възникващи в двулъчепречупваща среда, която граничи с повърхнината на разпространение на плазмоните. Показано е, че е възможно едновременно възбуждане на две плазмонни вълни, асистирано от ХТКС. Тези изводи частично се подкрепят от моделен експеримент, който показва и нови възможности за създаване на опорен канал при възбуждането на ППР в дифракционна решетка. Проведеното теоретично изследване предлага обяснение на проведените експерименти с азо-полимерен слой, отложен на повърхността на дифракционната решетка. Друг резултат в трета глава е установяването на структурните и технологични особености за изработването на позлатени дифракционни решетки за спектрално детектиране на ППР в режим на отражение и преминаване.

Дисертационният труд е разбираемо написан и оформен. Графичните резултати са представени добре. Голяма част от съкращенията са пояснени в отделен списък с означения. Литературните източници в библиографията са дадени в един стил, което според мене е факт, достоен за отбелязване. Докторант Евдокия Белина се фокусира върху излагането на резултати и тяхното обсъждане, при което негласно приема, че читателят е запознат добре с използваните физични величини и методи. Част от използваните понятия са дефинирани, но някои просто се споменават без коментар. Предполагам, че това описание е продиктувано от интердисциплинарния характер на изследването, водещ до необходимостта от въвеждане на твърде голям брой величини и понятия.

5. Научни и научно-приложни приноси на дисертационния труд

Настоящият дисертационен труд има голяма научно-приложна стойност, тъй като предлага разработен метод за директна имобилизация на разпознаващото вещество и биочип, базиран на ППР. Дисертационният труд също така има и теоретичен принос, показан с проведения теоретичен анализ на метод за възбуждане на двоен ППР за разпознаване на сигналите от специфични въздействия. Съгласна съм с формулираните от докторант Евдокия Белина приноси на дисертационния труд, които са класифицирани като оригинални научно-

приложни приноси. Моето определение на оригиналните резултати в дисертационния труд е както следва:

- 1) Предложен е експериментален метод за директна имобилизация на металопротеини, чрез разработване, оптимизиране и прилагане на технология MAPLE.
- 2) Разработен е биочип, базиран на ППР в дифракционна решетка, чрез директна имобилизация на хемоглобин и миоглобин.
- 3) Постигната е детекция на рекордно ниски концентрации на глюкоза, което потвърждава високата специфичност на директната имобилизация.
- 4) Теоретично е доказано, че чрез хирална анизотропна структура могат да бъдат възбудени едновременно два плазмонни резонанса в дифракционна решетка, които резонанси са спектрално разделени.
- 5) Експериментално е потвърдена възможността за възбуждане на двоен плазмонен резонанс в дифракционни решетки, чрез възбуждане с кръгово поляризирана полихроматина светлина.

Представените в дисертацията резултати са оригинални и достоверни.

6. Личен принос на дисертанта

Запознах се с докторант Белина още с постъпването ѝ в ИОМТ през 2017 г. През тези години тя винаги ми е правила впечатление като силно мотивирана, упорита и трудолюбива личност. Бях неволно свидетел на неуморния труд, който вложиха заедно с научния ѝ ръководител за внедряването, изпробването и оптимизирането на системата за отлагане на тънки слоеве по метода MAPLE. Искам да подчертая, че съм убедена в личния принос на докторантката за постигнатите резултати в представения дисертационен труд. Анализът на дисертационния труд и включените в него публикации също ми позволяват да заключа, че докторант Евдокия Белина има основна и водеща роля в проведените изследвания.

7. Публикации по дисертационния труд

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 публикации, от които две са с импакт-ранг (AIP Conference Proceeding и Proc. SPIE) и една публикация е в списанието Optics & Laser Technology, което е с висок импакт фактор равен на 3.319. В едната от публикациите докторант Евдокия Белина е на първо място. Статиите са публикувани от 2018 г. до 2020 г. Докторант Белина е участвала в дванадесет научни форума, от които 3 проведени в чужбина и девет в България. Участва и в проекти към ФНИ.

Докторант Евдокия Белина е представила всички необходими документи за провеждане на защитата. Наукометричните ѝ данни във връзка с дисертацията отговарят на изискванията за придобиване на ОНС „доктор“ в Закона за развитие на академичния състав в Република България.

8. Авторефератът е изготвен съгласно изискванията, като в него са отразени основните резултати, заключения и приноси на дисертационния труд.

9. Критични бележки, въпроси и препоръки

Като цяло дисертационният труд е добре изработен. Като забележки могат да се споменат наличието на правописни грешки и това че не всички величини са въведени, както споменах по-рано. Основната ми критика или по-скоро препоръка за изясняване е към експеримента в т. 3.2., фиг. 3.8 и условията при които е проведен този експеримент. Твърдението: „Поляризацията на възбуждащата вълна се променя, при преминаване през полимерния слой, чиито молекули са хаотично ориентирани“ и обяснението на фиг. 3.8а не са правилни. Когато азополимерният слой не е ориентиран, тоест е с хаотично разположени молекули (необлъчено състояние), то той е изотропен и не променя поляризацията на преминаващата вълна. Не е доуточнено обаче каква е възбуждащата светлина, което би дало яснота за процеса. Също не е показано кой азополимер е използван при качествен експеримент. Полимерът със съкратено име ПАЗО ли е или друг? Препоръчвам да се изяснят тези моменти. Критичните ми забележки по никакъв начин не омаловажават огромната работа, свършена от докторант Евдокия Белина, както и ценността на дисертацията.

Искам да задам следните въпроси:

- 1.) По какво се различават златна дифракционна решетка и позлатена поликарбонатна дифракционна решетка с еднакви други характеристики от гледна точка на приложението им в ППР?
- 2.) Правени ли са изчисления и анализ на характеристиките: дължина на разпространение на ПП и дълбочина на проникване на ПП на изследваната система (поликарбонатна дифракционна решетка/златен слой/металопротеинов слой), на двете граници: поликарбонат/злато и злато/металопротеинов слой, с цел да се установи дали има куплиране на двата ПП от двете страни на границата?

10. Заключение

В заключение искам да подчертая, че представеният за рецензиране дисертационен труд съдържа полезни за науката и практиката резултати, които ще намерят приложение при разработването на биосензори на принципа на повърхнинни плазмонни резонанси.

Докторант Евдокия Белина е свършила огромна по обем експериментална и теоретична работа. Усвоила е ценни умения, които ще ѝ бъдат полезни в бъдещата ѝ научна работа. Определено може да се каже, че докторант Евдокия Белина се е изградила като компетентен специалист с познания в редица области и самостоятелно мислене.

Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в ИОМТ-БАН. Представените материали и резултати в дисертацията напълно покриват специфичните изисквания в ИОМТ. Това ми дава основание да гласувам „за“ на заседанието на Научното жури и да препоръчам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на докторант Евдокия Огнянова Белина.

19.09.2020 г.

Подпис:

Заличено обявено
чл. 4, т. 1 от
Регл. (ЕС) 2016/679
/доц. д-р Димана Назърова/