

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

“Желатин съдържащи композитни материали с участието на зол-гелни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ ”

представен от Таня Неделчева Димова за присъждане на научната и образователна степен
“доктор”

в професионално направление: 5.10. Химични технологии (научна специалност Технология на композитните материали) с научни ръководители :

доц. д-р инж. Лъчезар Радев и

проф. д-р Маргарита Апостолова

Рецензент: проф. д-р инж. Маргарита Петрова Незнакова, Технически университет-София

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата.

Таня Димова е родена през 1982 год. През 2010 год. получава образователно квалификационната степен „магистър- фармацевт“, в Медицински университет-София. От 2011 г до момента е асистент в Медицински университет – Варна „Проф. д-р Параскев Стоянов“. Работи в направление „Фармацевтична химия и анализ“. От 2017 год. маг. фармацевт Таня Димова е зачислена (заповед № Р-ФХ-176/11.05.2017год.) като докторант на самостоятелна подготовка при катедра „Полимерно инженерство“ на ХТМУ по научната специалност “Технология на композитните материали” в професионално направление 5.10. Химични технологии, с научни ръководители доц. д-р Лъчезар Радев и проф. д-р Маргарита Апостолова ИМБ,БАН, считано от 01.04.2017 г. Със заповед № Р-ФХ-153/11.05.2018год е отчислена с право на защита.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Представената дисертация третира актуална тема, свързана със създаването на композитни материали, предназначени за приложение в регенеративната медицина и по-специално за възстановяване на костни дефекти, които могат да възникнат в резултат на травма, вродени недостатъци, заболявания като остеопороза или при отстраняване на тумори. Изложена е на 142 страници, илюстрирана е с 32 фигури и 30 таблици. Списъкът на литературата съдържа 289 източника. Дисертацията се състои от: Съдържание 2 стр., Списък на използвани съкращения- 1 стр., Въведение в което се мотивира интересът към зол-гелните биоактивни стъкла, Литературен обзор - 50 стр., след което на една страница, озаглавена Глава 2, са представени целта, задачите и основната теза на дисертационния труд. Следват глава 3- Експериментална част, в която са представени използваните материали, методите за получаване и за анализ на избраните зол-гелни биоактивни стъкла в системите $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ и желатинови композити- 9 стр. Основната глава „Резултати и дискусия“- Глава 5, е разделена на 5 подглави и е в обем 54 страници. **Изводите** и **Приносите** по дисертацията са изложени на 1 стр. и отново, независимо от това че са в обем на половин страница са означени като отделни глави 5 и 6. В края на представения материал са дадени списъци на публикации в български (2 броя), чуждестранни (2 броя) списания и участия в научни форуми у нас. В по-голямата си част те са на английски език. Не са забелязани цитирания. С малки изключения използваната литература е от публикации от последните 10 години. Целта на дисертационния труд на маг. фармацевт Таня Димова е формулирана ясно и точно. За постигането ѝ са поставени и решени конкретни адекватни задачи. Представена е

т.нар. „Теза на дисертационния труд“, чрез която са прави допускане, което би трябвало да се докаже в края на представения дисертационен труд.

Тематиката на дисертацията на Таня Димова е продължение на изследванията на доц. д-р инж. Лъчезар Радев по създаването на нови стъкло-керамични композити за костно - регенеративната медицина с участие на природни полимери (фиброин, коприна и желатин) и тяхното изследване.

Литературният обзор е онагледен с 8 фигури и 13 таблици. Разделен е на 8 подглави. Започва с представяне на структурата на костната тъкан. Кратко е разгледан процесът на формиране на костна тъкан и основните тъканно-инженерни подходи за костна регенерация. Особено внимание се отделя върху биоактивните материали за костна регенерация и е дадена класификацията им в четири групи: полимер - полимерни композити, напълнени полимерни композити, полимерни нанокомпозити и полимерни композити със специфични свойства. Разгледани са строежът, структурата и биохимията на полимери с белтъчен произход, на полизахариди и микробиални полиестери. Много добре, в таблици, са обобщени литературните данни за свойствата, предимствата и недостатъците на природните полимери със значение за костната и хрущялна регенерация. Отделено е специално място за ролята на колагена (глави 2.2 и 2.3) и желатина (глава 3.2) в процесите на биоминерализация.

Намирам, направеното обобщение в таблици 3 и 4 на видовете композитни материали с участие на колаген и характеристиките на лиофилизирани желатинови матрици, въз основа на направения литературен преглед за много удачно.

Литературният преглед по дисертацията условно е разделен на две- биоактивни стъкла от неорганични оксиди и композитни материали с участието на желатин .

В частта 6.3 „Силикатни стъкла“, разделена на 5 части се разглеждат: Биоактивни стъкла - в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$; Зол-гелни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ модифицирани с различни оксиди; Биоактивни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-Ag}_2\text{O}$; Биоактивни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ и Биоактивни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, дотирани с други метални оксиди. Отделено е място за видовете калциево-фосфатни керамики и тяхното клинично приложение в ортопедията и денталната медицина (обобщение в таблица 6); калциево-фосфатните цименти и разбира се на биоактивните стъкла. Разгледани са свойствата на фосфатните, боратни, силикатни стъкла. Направено е сравнение на техните свойства. Подробно са обсъдени биоактивните стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ (таблица 7- 11). Въз основа на това, трикомпонентната и $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и четири компонентната $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ системи, които по литературни данни показват силна биоактивност са избрани за обект на изследването. В част 7 се отделя място на смесените неорганично-органични композити с участие на желатин: желатин/апатитни, желатин / бифазен калциев фосфат, желатин / биостъкло композитни материали. В точка 8 на същата глава се разглежда разтварянето и *in vitro* биоактивността на зол-гелни стъкла и композитни материали, и влиянието на различни фактори като рН и състава на разтвора. Прегледът завършва с очертаване на ролята на освобождаващите се йони от BG и BG/G в костния метаболизъм и определяне на необходимите условия, на които тези материали трябва да отговарят. Прави се заключение че е необходимо по-задълбочено изучаване на промяната във фазовия състав на системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ и това, че желатинът е най-подходящ полимер за композитни матрици, тъй като е достъпен, широко използван и ефективен за регенерация на твърди и меки тъкани.

Обобщаването в таблици, прави изложението ясно, логично и лесно за четене. От направения литературен преглед след всяка глава са изведени изводи, които се използват при

анализа на получените експериментални резултати. Подробното разглеждане на желатина, неговата природа, строеж, свойства и пространствена структура е обяснимо, тъй като това е природният полимер, който е избран за работа при получаване на композитните материали, предмет на изследване на настоящата дисертация. Наред с това, доста място е отредено на представянето на биоактивни стъкла и биокерамики, другата компонента на биокompозитните материали за регенерация на костни тъкани. Формулирани са основните изводи относно синтеза, механичните свойства, биоактивността, биоразградимостта и биосъвместимостта на силикатните стъкла. Анализирайки критично данните от литературния обзор, докторантката е формулирала заключение от 5 точки, които логично определят целта на дисертацията и основните задачи за постигането ѝ.

Глава 3. Експериментална част, включва описание на материалите, използвания метод за синтез на зол-гелни биоактивни стъкла в системите $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ и желатиновите композити. Получените композитни материали със състав BG/Gel са характеризирани чрез рентгено структурен анализ (XRD), инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR) и сканираща електронна микроскопия (SEM). Обосновано са избрани използваните съвременни инструментални методи за фазово-структурно охарактеризиране на получаваните материали. Изследвана е *in vitro* биосъвместимостта с MG-63 с остеобластоподобни клетки. Подробното описание на използваните методики за това определение, дава основание да се оцени корекността на извършената експериментална работа.

Глава 4. Резултати и дискусия: Този раздел съдържа няколко части, които обобщават резултатите от изследването на синтезираните стъкло-керамики и на желатин съдържащите композитни материали с участието на зол-гелни стъкла композитни материали. Извършено е физикохимично характеризиране с помощта на рентгеноструктурен (XRD) анализ, анализ на инфрачервените спектри на зол-гелни стъкла с различно съдържание на Ag_2O , сканираща електронна микроскопия, преди *in vitro* тестовете в SBF. Идентифицирани са кристалните фази в изследваните стъклокерамики. Установено е, че количества от 1% и 2% Ag_2O , не оказват влияние върху фазовия състав, но формирането на нестабилните фази от ватерит и арагонит може да окаже влияние върху *in vitro* биоактивността на изследваните образци BG1 и BG2, поради по-високата им разтворимост. Разлагането на ИЧ спектри в таблици 15 и 16, показва съгласие с резултатите, получени с XRD анализа.

Проведените SEM изследвания на образците показват, че синтезираните BG с различни количества Ag_2O в състава си, могат да образуват *in situ* различни полиморфни форми на CaCO_3 по повърхността си и имат хетерогенна микроструктура, която съответства на сложния им полифазен състав. Може да се съжалева, че част от приложените микроскопски снимки не са съвсем ясни. Физикохимично характеризиране на желатин съдържащи композитни материали с участието на зол-гелни стъкла показва, че са получени органично-неорганични композитни материали със състав BG/Gel което се доказва с данните от XRD и FTIR анализа. Получените структури, дават възможност за нарастване на хидроксипатитни кристали и за прикрепване на остеобластни клетки. Наблюдаваните агрегати от частици, са *in situ* получени хидроксипатитни кристали и други кристални фази (HA, Vt, At, Ct, Wt), установени при рентгеноструктурния анализ и ИЧ-спектроскопия.

Синтезираните и изследвани зол-гелни биоактивни стъкла проявяват *in vitro* биоактивност, като на повърхността им се откриват Si, Ca, P и Cl (който присъстват в разтвора на SBF), което е доказателство за наличието на SGBG.

Дисертантката прави извод на основа на FTIR анализа, че след престояване на изследваните SGBG в разтвор на 1,5 SBF за период от 12 дни при статични условия и след *in vitro* теста по повърхността на синтезираните SGBG се формира карбонат апатит В-тип (BCO_3HA), което е доказателство за протекли процеси на образуване на кристален НА на повърхността на образците. Образуването на апатит върху повърхността на образците е и доказателство за биоактивност. Установеното наличие на кухини в образците при SEM – EDX анализа след *in vitro* теста за биоактивност в 1,5 SBF в резултат на частично разтваряне в разтвора наподобяващ кръвна плазма, се приема като вторичен критерий за биоактивност.

Промяната в химичния състав на повърхността на образците от стъклокерамика (образуване на карбонат апатит), доказано с използваните методи за анализ, дава основание да се предположи, че те биха могли да бъдат използвани в състава на различни материали за костно-регенеративни цели.

И накрая особено подробно е извършено биологично характеризирание на разработените стъкла и композити. Оценен е биологичният ефект на стъкла BG и изследваните композити 80BG/20G върху MG-63 клетки, които показват че стъклата и композитите с включено сребро, притежават токсичен ефект и не могат да бъдат използвани за създаването на биосъвместими материали в концентрации по-високи от $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. След извършване на имунофлуорисцентен анализ за F-актин и оцветяване с ализариново червено за минерализация е изследвана възможността MG-63 клетки да диференцират в остеостимулираща среда в присъствие на стъклата BG0, BG1 и композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G. Получените резултати показват, че BG0 и 80BG0/20G могат да предизвикат остеогенна диференциация. Така проведените опити с клетки на остеосаркома MG63 показват, че два от изследваните материали, посочени по-горе създават благоприятна среда за пролиферация и диференциация на остеобластите *in vivo*.

В края на дисертационния труд са представени 5 извода и 3 приноса, които отразяват същността на работата.

5. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Представеният автореферат е написан на 41 страници, съдържа 12 таблици и 16 фигури. Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и напълно съответства на съдържанието на дисертацията, като отразява най-съществените резултати от нея. Авторефератът позволява изграждането на достатъчно пълна представа за съдържанието и приносите на дисертацията. Към автореферата имам и някои забележки. Не е спазена последователността на номериране на включените таблици. В текста се дискутират номера на таблици (например таблици 3,4) които не са дадени в автореферата. Даден е списък на използваната литература и е представен списък с публикациите по темата на дисертационния труд. Както и в представения дисертационен труд, така и в автореферата е приложен списък от участия в научни форуми. Тъй като тези доклади не са дадени в материалите предоставени от докторантката, не става ясно до каква степен касаят резултатите от разглежданата научна разработка. В доклади 1-5 от списъка, не са посочени авторите на публикациите, както и тематиката няма нищо общо с обсъждане докторат.

6. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Като най-съществени приноси на разработката могат да се изтъкнат:

- Получени са композитни материали със състав желатин / зол-гелно стъкло. Те, заедно със зол-гелните стъкла проявяват много добра *in vitro* биоактивност в разтвор на 1,5 SBF, което е указание за възможността да бъдат използвани в костно-регенеративната медицина.

-За пръв път е доказано, че среброто (в зол-гелните стъкла и композитните желатин-съдържащи материали) има пряко катализиращо влияние върху *in vitro* биоактивността на образците.

- Стъклата и композитите, в чиито състав е включено сребро, притежават токсичен ефект върху изследваната клетъчна линия (MG63) и не трябва да бъдат използвани за създаване на биосъвместими материали в концентрации по-високи $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Представеният дисертационен труд съдържа научно-приложни резултати, които могат да бъдат оценени като оригинален принос в технологията на композитните материали за регенеративната медицина.

7. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

Резултати от работата по дисертацията са публикувани в 2 броя статии, отпечатани в списание Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR), 2017 год. , в които докторантката е на 4 място и 2 броя статии в българското списание на английски език Industrial Technologies, където Таня Димова е на първо място. Съгласно действащия към момента на разкриване на процедурата по защита Правилник за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ, чл. 11, ал. 4 „Дисертационният труд трябва да се основава най-малко на една научна публикация в списание с импакт-фактор, или на 2 научни публикации в специализирани издания без импакт-фактор, или на три научни публикации в доклади на международни научни форуми, отпечатани в пълен текст в сборници с редактор”. По тази причина приемам, че са изпълнени изискванията по отношение на броя публикации върху научни резултати, получени при разработване на настоящата дисертация.

Въпреки това не става ясно, защо е приложен списък на докладите/ постерите представени на национални научни конференции, симпозиуми и семинари, като в 5 тях липсват имената на авторите (от 1-5 от приложения списък). От представянията, с устен доклад са 3 (изнесени от кандидатката) и 9 са постерни съобщения.

8. Критични бележки и коментари:

Като цяло дисертационният труд е написан добре, получените зол-гелни стъкла и желатинсъдържащи композити са охарактеризирани с подходящи методи, а интерпретирането на резултатите е убедително.

Има стилови и граматични неточности, като се използва „поръзност“ вместо „порестост“, „дотиране“, „повърхностна химия“, „модулират механични свойства“, „матрис“, „гелира“ и т.н.

Нямам съществени забележки , само няколко уточнения и въпроси към дисертанта:

1. Как хомогенизираните - разбъркване, ултра звук и какви са параметри на процеса. По какъв метод установявате времетраенето на процеса и хомогенността на получения зол.
2. Говорите за частично разтваряне, като доказателство за биоактивност. Как оценявате това разтваряне. Ако е по- загубата на маса, имате ли данни за това. Имате ли повторимост на получаваните резултати. Възможно ли е част от желатина да се разтваря във физиологичната среда.
3. Добре би било да се упомене в текста, къде са проведени биологичните експерименти, тъй като няма приложени публикации в тази област.

9. Лични впечатления за дисертанта Не познавам ас. Таня Димова.

Заклучение:

Дисертацията на ас. Таня Димова е продължение на изследвания провеждани от група на на доц. Л.Радев, за създаване на биологично активни стъкла и композити с участие на природни полимери. В рамките на дисертационния труд, докторантката е извършила голям обем експериментална работа в тази актуалната научна област за създаване на продукти с приложение за костна регенерация. Изследването е дисертабилно, насочено към намиране на нови факти и създаване на нови знания в областта на синтеза, биологичната активност и приложение. Получените от докторантката резултати дават основание за по-нататъшно продължаване на изследванията с разширяване на частта за приложение в ргенеративната медицина. Качеството на дисертационния труд и изложеното в рецензията ми дават основание да предложа на членовете на Научното жури да дадат положителна оценка на представената дисертация и подкрепят присъждането на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 5.10. Химични технологии (научната специалност “Технология на композитните материали) на еделчева Димова

София, 16.01.2019 г.

Рецензент:

/проф. д-р инж. М. Незнакова/