

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема

“Нови коприна/стъкло-керамични композити за регенеративната медицина”

представен от инж. Христо Руменов Георгиев

за присъждане на научната и образователна степен “доктор”

в професионално направление: 5.10. Химични технологии (научна специалност

Технология на композитните материали)

с научен ръководител :

доц. д-р инж. Лъчезар Радев

Рецензент: доц. д-р инж. М. Симеонова, катедра “Полимерно инженерство”, ХТМУ

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

Инж. Христо Руменов Георгиев е роден през 1985 год. Средно образование е завършил в Професионална гимназия по Екология и Биотехнология „проф. д-р Асен Златаров” - София със специалност „Технология на опазване на околната среда” през 2005 год. През 2010 год. получава образователно квалификационната степен „бакалавър,, в ХТМУ по специалността „Материалознание”, а през 2011г. - магистърска степен по „Полимерни материали”. Дипломните работи и за двете образователно квалификационни степени е изработил в Университета в Авейро, Португалия.

От 2012 год. инж. Христо Георгиев е зачислен (заповед № Р-ФХ-45/23.02.2012год.) като редовен докторант при катедра „Полимерно инженерство“ на ХТМУ по научната специалност “Технология на композитните материали” в професионално направление 5.10. Химични технологии, с научен ръководител доц. д-р Лъчезар Радев. Със заповед № Р-ФХ-179 от 28.06.2016 год. на зам. Ректора по Научни дейности е отчислен с право на защита.

След отчисляването си е работил като химик аналитик в “ХИМАТЕХ” АД – гр.София. В момента е химик аналитик в “Биотрейд България» ООД.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Представената дисертация се занимава с един актуален въпрос, засягащ създаването на композитни материали, с възможност за приложение в регенеративната медицина и по-специално при регенерацията на костна тъкан. Дисертацията е изложена на 121 страници, от които 1 стр. използвани съкращения, 2 стр. увод, 41 стр. – литературен преглед, 9 стр. - експериментална част, целта и задачите са представени на 2 стр., 47 страници резултати и дискусия, изводите са 2 стр. и приноси по дисертацията са изложени 1 стр.; списък с публикации и забелязани цитирания – на 2 страници, използвана литература 252 източника, представени на 13 страници. Около 37% са литература, публикувана през последните 10 години. Дисертацията съдържа 36 фигури и 12 таблици.

Целта на дисертационния труд на инж. Георгиев е формулирана ясно и точно. За постигането ѝ са поставени и решени конкретни адекватни задачи:

Литературният обзор, представен на 41 стр., е подходящо онагледен с 10 фигури и 7 таблици. Написан е ясно, логиката на изложението се следва лесно и се чете с лекота. Подробно са представени съставът и структурата на костната тъкан. Разгледани са строежът, структурата и биохимията на колагена като основен органичен компонент на костната тъкан, както и минерализацията му в нея. Отделено е място за хидроксилапатита, основен компонент на неорганичната материя, включена в състава на костта. Направена е съпоставка и е отбелязана разликата между природния минерал и биологичния му аналог в костните тъкани и са представени типовете заместване в кристалния хидроксилапатит за получаване на карбонат заместен хидроксилапатит. Представени са дефиниции за биоактивен материал и е направен преглед на съществуващите биоматериали за костна регенерация, като са разгледани видовете фиксации към костната тъкан. Прегледът завършва с очертаване на необходимите условия, на които тези материали трябва да отговарят. Доста подробно е разгледан фиброинът, получен от естествена коприна. Дискутирани са неговата природа, строеж и свойства, пространствена структура, разположението на полипептидните вериги в молекулата му, получаването и приложението му за медицински цели. Това е обяснимо, тъй като това е природният полимер, с който е избрано да се работи 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 биокомпозитните материали за регенерация на костни тъкани. Представен е механизмът на

формирне на хидроксилпатит при стъкла и керамики, видовете биостъкла и керамики за приложение в медицината, очертана е ролята на магнезия в някои видове зол-гелни стъкла и стъкло-керамики по отношение на механичните им свойства. Формулирани са основните изводи относно синтеза, механичните свойства, биоактивността, биоразградимостта и биосъвместимостта на калциевосиликатни магнезий-съдържащи керамики. Описан е тест за *in vitro* охарактеризиране на биоактивността на материалите *в моделни солеви разтвори*, която се определя от биоразградимостта им и формирането на нова костна тъкан. В тази връзка са разгледани и факторите, влияещи върху разтварянето и биоактивността на материалите. И накрая е отделено място на биомиметични композитни материали, изградени с участието на фиброин. Анализирайки критично данните от литературния обзор, докторантът е формулирал 8 извода, които логично определят целта на дисертацията и основните задачи за постигането ѝ.

Раздел II. Експериментална част включва описание на различни методики за синтез на биоактивни материали (получаване на разтвор на фиброин, синтезиране на стъкло-керамики в системата $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ по многостъпален модифициран зол-гел метод, получаване на композитни материали в състав фиброин и калциево фосфат силикатна керамика по зол-гел метод), използваните съвременни инструментални методи за фазово-структурно охарактеризиране на получаваните материали. Описани са тестовете за определяне на *in vitro* биоактивността на синтезираната стъклокерамика и композити *в моделни солеви разтвори*, *наподобяващи телесни течности* и *in vitro* тест за оценка на цитотоксичността и биоактивността на синтезираните композити спрямо човешки остеосаркомни клетки линия MG63. В този раздел са включени 2 таблици, представящи състава на гелове на синтезираните магнезий съдържащи калциеви фосфатни силикатни керамики и на синтезираните коприна/стъкло-керамика композитни материали. Според мен, мястото на тези таблици /Таблици 8 и 9/ е по-скоро в раздела Резултати и дискусия.

Раздел III. Резултати и дискусия

Този раздел обобщава в няколко части резултатите от изследването на синтезираните стъкло-керамики и композитни материали от типа фиброин/стъкло-керамики.

Най-напред, в резултат на проведена серия от експерименти са **получени две нови стъклокерамики в системата $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$** по зол-гел метод, с молно

съотношение $\text{Ca}+\text{Mg}/\text{Si}+\text{P} = 1$ (C-1) и $\text{Ca}+\text{Mg}/\text{Si}+\text{P} = 2.18$ (C-2), които са фазово-структурно охарактеризирани чрез подходящи модерни инструментални методи. Чрез рентгеноструктурен анализ са идентифицирани кристалните фази в двете стъклокерамики, които ги определят като структурно различни и оригинални. Установените кристални фази са предпоставка за потенциална биоактивност. Резултатите от проведения анализ на двата материала с FT-IR са в съгласие с идентифицираните кристални фази и потвърждават структурното различие на синтезираните стъклокерамики и полифазния им състав, включващ силикатни и фосфатни аморфни и кристални фази. Проведените SEM изследвания на образците показват хетерогенна микроструктура, която съответства на сложния им полифазен състав. Синтезираните стъклокерамики проявяват *in vitro* биоактивност след 14 дневен престой в TRIS-HCl буфер при статични условия. Като доказателство за тази биоактивност се изтъква образуването на апатит върху повърхността на образците. Промяната на фазовия състав на образците (пълно или частично разтваряне на кристалните фази от изходната стъклокерамика и образуването на нови фази), след престоя им в TRIS-HCl буфер е документирана чрез рентгеноструктурни дифрактограми и потвърдена от техните FT-IR спектри. С проведеното SEM наблюдение на образци от третираните стъклокерамики се установава, че повърхността им е покрита с карбонат апатитен слой с различна морфология апатит и наличие на големи кухини, което се свързва с протекли процеси на разтваряне в TRIS-HCl буфера. Промяната в химичния състав на повърхността на образците от стъклокерамика (образуване на карбонат апатит) след 14 дневен престой в TRIS-HCl буфер е потвърдена и с рентгенова фотоелектронна спектроскопия.

На следващ етап на основата на престоялите 14 дни в TRIS-HCl буфер две стъкло-керамики, с отложен карбонат апатит и хидромагнезит върху повърхността им, са **създадени два нови фиброин/стъклокерамика композити** с 3 различни тегловни съотношения на неорганичния и органичен компонент (80:20, 50:50 и 20:80), *което е нов и оригинален подход към синтез на подобни композитни материали*. Двете серии композитни материали са охарактеризирани чрез рентгенодифракционен анализ и FT-IR спектроскопия, потвърждаващи наличието на основните кристални фази на стъклокерамиките с известни промени в съотношението между тях и присъствието на неорганичния и органичен компонент, съответно. Проведеният 14 дневен тест в 1.5 солеви

разтвор, наподобяващ телесни течности (SBF) при статични условия за оценка на *in vitro* биоактивността на композитите, потвърждава биоактивността им чрез способността да натрупват на повърхността карбонат съдържащ хидроксиапатит, в който се установява заместване от A⁺ и B⁺ тип, определящо го като биоапатит, документирана чрез рентгеноструктурен и FT-IR анализи. Проведеният с рентгенова фотоелектронна спектроскопия анализ потвърждава образуването на хидроксиапатит в изследваните фиброин / стъкло-керамични композитни материали (с различно тегловно съотношение на двата компонента) в съответствие с резултатите от рентгеноструктурния анализ и FTIR спектроскопия.

И накрая са проведени биологични опити в *in vitro* условия с клетъчни култури от остеосаркомни клетки линия MG63 за оценка на цитотоксичността и биоактивността на получените композитни материали, както и на възможността на тестираните материали да осигуряват условия за пролиферация и диференциация на клетките. Резултатите показват, че и двата материала не проявяват токсичен ефект в изследвания концентрационен диапазон за седем дневен период на третиране на клетките. Проучен е и ефектът на C1F80/20 и C2F80/20 върху минерализацията на MG63 клетките за период до 21 дни, като показател за напреднала клетъчна диференциация. Наблюдавана е диференциация в третираните клетки, индуцирана от калциевите възли, където клетките са в контакт с композитите. За оценка на биоактивността на MG63 клетките, култивирани в присъствието на C1F и C2F композити в продължение на 7 и 21 дни е определяна алкалната фосфатазна – (ALP) активност. Получените резултати показват, че ALP активността на MG63 клетките, е приблизително 4 пъти по-висока на 21-ия ден, отколкото на 7-ия ден. С други думи, проведените опити с клетки на остеосаркома MG63 показват, че композитите създават благоприятна среда за пролиферация и диференциация на остеобластите *in vivo*.

В края на дисертационния труд са представени 9 извода и 3 приноса, които са добре формулирани и отразяват същността на работата.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Представеният автореферат е написан на 39 страници, съдържа 4 таблици и 17 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 фигури, които не съответстват на представените в съдържанието на автореферата. Тъй като към автореферата няма приложена библиография, намирам за неуместно цитиране на автори или номера на литература в текста: “[191] и “[251]“ (стр. 22), “Хе и др.“ и “Ramya“ (стр. 25, “Ма и съавтори” (стр. 29), “Solla и съавтори» (стр. 31). Текстът трябва да се преработи, като се премахнат съответните цитирания. Необходимо е представеният списък с публикации по темата на дисертационния труд да се съобрази с дискутираното в т.5 от настоящата рецензия.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

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

Изтъкнатите приноси са:

- синтезиране на две нови стъкло-керамики с различно молно отношение на компонентите, влизащи в състава на гела за синтез и доказване на тяхната висока *in vitro* биоактивност.

- използване на нов подход за получаването на коприна/стъкло-керамични композитни материали чрез третиране на керамиките в TRIS-HCl буфер, водещо до значителна *in vitro* активност.

- доказване на биологичната активност на синтезираните нови коприна/стъкло-керамични композитни материали, с потенциална възможност за бъдещи клинични приложения

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

Резултати от работата по дисертацията са публикувани в 2 броя статии, отпечатани в списание с IF (Processing and Application of Ceramics, IF = 1.070) през 2016 и 2017 год.

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”. С представените по-горе 2 публикации в Processing and Application of Ceramics (IF=1.070) посоченото минимално изискване е изпълнено.

По двете статии, публикувани в Processing and Application of Ceramics, към момента на разкриване на процедурата по защитата вече са забелязани общо **3 цитата** – два през 2017 год. за статията, публикувана през 2016 год и един от 2018 год. за статията, публикувана през 2017 год, което е добър атестат за актуалността на проблема и получените резултати.

Към списъка с публикации са представени и две други статии:

Lachezar Radev, Todor Gerganov, Hristo Georgiev, **Antony Kolev**, Violeta Vassileva, Rumiana Iankova, Ekaterina Cholakova, Silk fibroin/calcium phosphate silicate composites: In vitro bioactivity. *International Journal of Materials and Chemistry* 2013, 3(3A): 8-15.

Antony Kolev, Violeta Vassileva, Hristo Georgiev, Interaction between fibroin and alginate in the corresponding blended films, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52, 3, 2017, 449-456. (SJIR=0.194)

Тези последни две статии, обаче, са включени в списъка (под №№ 1 и 4 в автореферата) с публикации по дисертация, защитена на 25.04.2017г. от инж. Антоний Йорданов Колев за присъждане на образователната и научна степен “доктор” по научна специалност 5.10. Химични Технологии (Химична технология на влакнестите материали), с научни ръководители доц. д-р инж. Виолета Василева и доц. д-р инж. Лъчезар Радев. По тази причина, не мога да приема, че те са част от публикациите върху научни резултати, получени при разработване на настоящата дисертация.

6. Критични бележки и коментари:

Като цяло дисертационният труд е написан добре и представените критични бележки не засягат същността на изследването и интерпретирането на резултатите, а са свързани с технически пропуски при оформянето и по-скоро трябва да се възприемат като препоръки.

Към дисертанта имам един уточняващ въпрос:

Уточнете използваната единица за концентрации „ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ”, тъй като говорейки за концентрация на вещество обикновено имаме предвид количество вещество в определен обем”.

Някои от по-съществените забележки са:

1. В “Експерименталната част” не са описани материалите, с които са провеждани синтезите на биокерамиките и композитите. Изключение правят само средите и реагентите, използвани при оценка на цитотоксичността и биосъвместимостта на синтезираните композитни материали спрямо човешки остеосаркомни клетки линия MG63, проведена в *in vitro* условия, които са описани в самите тестове.

2. Установява се несъответствие между дискутираните стойности на разложените фотоелектронни спектри на синтезираните стъклокерамики и представените в Таблица 11 стойности за O1s е 531.01 за образец C2F.

3. Налице е сериозно объркване в цитирането и номерацията на използваната литература: не е използван единен стил за представяне на списъка с цитираните литературни източници - имената на авторите са представяни по различен начин, някъде са цитирани и заглавия на статиите (№39, 46, 48, 86), в някои е цитиран doi (№ 43,47,49,51,54,56,58, 142) или PubMed (№ 46,50) номер, в някои източници няма посочени страници (№ 52). Срещат се неправилно изписани списания (№ 23 “Bioessays”); в представения списък има пропусната литература (липсват № 177 и № 201) и повтарящи се източници с различни номера (лит. с №115 е идентична с №127; с. в текста е цитиран неколkokратно литературен източник с №253, какъвто няма в листа с използвана литература. В същото време, не забелязах цитирани лит. № 84, 115, 133-136 вкл., 175, 184, 196, 212, 231-234, 242,244, 248; не е спазена последователността за номериране на източниците по реда на тяхното цитиране в текста особено силно е объркването на стр 74 (лит 251 е цитирана след №183), на стр. 94 и стр. 97.

7. Лични впечатления за дисертанта

Познавам инж. Христо Георгиев като студент в бакалавърската и магистърска степен в катедра «Полимерно инженерство». Впечатленията ми от контактите с него по време на учебния процес и извън него са за един любознателен, учтив, старателен и отговорен млад човек.

Заключение:

Представеният от инж. Христо Георгиев дисертационен труд е актуален и съдържа оригинални научни приноси, които могат да обогатят знанията в областта на биоматериалите, с потенциално приложение в регенеративната медицина. Представените резултати по обем и качество съответстват на изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на ХТМУ и ЗРАСРБ, което е основание да дам **положителна оценка** на дисертационния труд.

Несъмнените достойнства 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 инж. Христо Руменов Георгиев.

София, 15.06.2018 г.

Рецензент:
/доц. д-р инж. М. Симеонова/