

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*”

по научната специалност:

5.10. Химични технологии (Технология на композитните материали)

с научни ръководители:

доц. д-р Лъчезар Радев

проф. д-р Маргарита Апостолова

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

Представената за рецензия дисертация е посветена на получаването на композитни материали на основата на силикатни биостъкла, съдържащи сребро и желатин, с намерение последните да намерят приложение като материал за костна регенерация, подпомагащ и стимулиращ естествените регенеративни механизми на човешкото тяло. Представените в дисертационния труд изследвания са в една интересна, бързо развиваща се интердисциплинарна област на тъканното инженерство.

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

Таня Неделчева Димова е родена в гр. Варна през 1982г. През 2010г. завършва Медицински университет, гр. София, със специалност „Фармация” като придобива професионална квалификация и правоспособност „магистър-фармацевт”.

От септември 2011г. до момента работи като асистент по фармацевтична химия и анализ във Фармацевтичния факултет на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов”, гр. Варна. Зачислена е като докторант на самостоятелна подготовка при катедра „Полимерно инженерство” на ХТМУ по научната специалност 5.10. Химични технологии (Технология на композитните материали) от 01.04.2017г., със срок на обучение 3 години (заповед № Р-ФХ-176/11.05.2017г.). Отчислена е с право на защита от 26.04.2018 г. със заповед на ректора Р-ФХ-153/11.05.2018г.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите:

Дисертацията е изложена на 142 страници, съдържа 32 фигури и 30 таблици. Литературният обзор обхваща 287 литературни източника (над 60% от тях са публикувани през последните 10 години).

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

Глава 1. **Литературният обзор**, представен на 51 стр. и подходящо онагледен с 8 фигури и 13 таблици, е изключително подробен и насочен към поставения научен проблем. Представена е високоорганизираната структура на костната тъкан, клетките, изграждащи костната тъкан и тяхната роля в естествения процес на регенерация, както и неговият механизъм. Разгледани са 2 различни тъканно-инженерни подхода за костна регенерация чрез въвеждане на имплантни матрици, служещи като “шаблон”, подпомагащ регенерацията: 1) *въвеждане на растежни фактори в имплантни материали за ускоряване на клетъчната регенерация* и 2) *въвеждане на клетки в имплантни материали*. Представена е класификация на биоматериалите *според начина на фиксация с костта и според предизвикания отговор*. Обърнато е внимание на полимерните материали за синтез на имплантни композити със специфични свойства. Детайлно е разгледана ролята на колагена в процесите на биоминерализация и видовете композитни материали с негово участие. Направен е преглед и на желатин съдържащите материали с приложение в тъканното инженерство, като са подчертани предимствата и недостатъците на желатина като материал за регенеративни цели.

Като част от биоактивните материали за костна регенерация са представени и калциево-фосфатните керамики, калциево-фосфатните цименти и биоактивните стъкла (фосфатни, боратни и силикатни). Въз основа на направения преглед на биоактивните стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и обобщените по-важни заключения от него, тази система е избрана като основно биоактивно стъкло за разработване на дисертацията. Представени са и зол-гелните стъкла от същата система, модифицирани с различни метални оксиди. Отбелязано е, че най-важно е постигането на антибактериален ефект, а среброто е най-подходящ и предпочитан елемент за дотиране на силикатно стъкло. На шест страници са представени видовете композитни материали с участието на желатин. Дисертантката е разгледала разтварянето и *in vitro* биоактивността в моделни разтвори на зол-гелни стъкла и композитни материали, както и факторите, влияещи върху тях. Представено е формирането на карбонат съдържащ хидроксиапатит и биологичния отговор спрямо йонните продукти, както и ролята на освобождаващите се йони в костния метаболизъм. Литературният обзор завършва със заключения относно метода за синтез на биостъкла в

системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, въвеждането на Ag_2O , условията на термична обработка, промяната във фазовия състав и избора на желатин като най-подходящ полимер за композитната матрица, които са определили целта и задачите на дисертационния труд.

Глава 3. Експерименталната част, представена на 9 страници, съдържа 1 таблица и 3 фигури. Освен използваните материали, са описани синтеза 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 получаването на желатинови композити на тяхна основа. Представени са избраните инструментални методи за охарактеризиране фазовия състав и морфологията на биостъклата и композитите - рентгенова прахова дифракция (XRD), инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FT-IR), сканираща електронна микроскопия (SEM) и SEM-EDX (енергетично-дисперсионна рентгенова спектроскопия). Описан е теста за *in vitro* биоактивност на синтезираните зол-гелни стъкла и получените композити в моделен солеви разтвор (SBF). Представени са детайлно всички методи за *in vitro* оценка в клетъчни култури от остеоподобни клетки линия MG-63 на зол-гелни биостъкла, съдържащи сребро и желатин-съдържащи композити на тяхна основа.

Глава 4. Резултати и дискусия е представена на 55 стр. и онагледена с 21 фигури и 16 таблици. Направеният анализ на получените резултати е позволил дефинирането на ясни зависимости и извеждането на логични изводи.

Синтезирани са 4 зол-гелни биоактивни стъкла (BG0, BG1, BG2 и BG3) в системите $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, с различно съдържание на Ag_2O (0-4 wt%). Проведеният рентгенофазов анализ чрез XRD след термично третиране при 600°C в продължение на 6 часа на образците показва, че са получени SGBG с различен фазов състав в зависимост от съдържанието на Ag_2O . Образците без и с ниско съдържание на Ag_2O имат сходен фазов състав – съдържат три полиморфни фази на CaCO_3 (ватерит, арагонит и калцит) в различно процентно съотношение. С нарастване на съдържанието на Ag_2O в гела за синтез до 4 wt % се появяват нови фази - воластонит и хидроксипатит. Установеният чрез XRD фазов състав на синтезираните биостъкла и потвърден от проведения с FT-IR анализ е предпоставка за висока *in vitro* биоактивност. Наблюдението със SEM на повърхности на образците показва наличие на макроагломерати от сфероидални частици, които са отдадени на хидроксипатитни кристали, а при образците с високо съдържание на Ag_2O са видими и кристали на Ag^0 , което е в съгласие с резултатите, получени от XDR и FTIR.

На основата на 4-те зол-гелни биоактивни стъкла, с различно съдържание на Ag_2O са получени желатин-съдържащи композитни материали в съотношение

биостъкло:желатин = 80:20 (80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G), които също са охарактеризирани с XDR, FTIR и SEM. По данните от XDR, композитите не се различават съществено по фазов състав от биостъклата, участващи в състава им. Във всички композити е установено образуване на НА, като в композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G преобладават полиморфните форми на CaCO_3 арагонит и калцит, докато в композита 80BG2/20G преобладава полиморфната форма ватерит, която е нестабилна и би могла да бъде предпоставка за повишената му *in vitro* биоактивност. Чрез FTIR-спектроскопия е потвърдено получаването на органично-неорганични композити със състав BG/Gel, които не се отличават съществено по фазов състав от зол-гелните биостъкла, участващи в тях. Установеното частично разтваряне на воластонит в разтвора на Gel потвърждава очакването за по-добра *in vitro* биоактивност на изследваните образци. Наблюдаваната със SEM морфология на повърхността на композитите показва структури, даващи възможност за нарастване на хидроксиапатитни кристали и за прикрепване на остеобластни клетки.

За потвърждаване на очакваната *in vitro* биоактивност на синтезираните зол-гелни биостъкла, съдържащи сребро и получените желатин-съдържащи композити на тяхна основа е проведен тест за *in vitro* биоактивност в моделен солеви разтвор (1.5 SBF) при статични условия. За документиране на евентуално настъпили промени във фазовия и композиционен състав, както и в морфологията, образците са изследвани с XDR, FTIR и SEM-EDX.

Рентгеноструктурният анализ установява тенденция за нарастване количеството на хидроксиапатит в образците от биостъкла след престоя в 1.5 SBF и пълно разтваряне на арагонита и ватерита. Присъствието във FTIR спектрите на високо интензивна ивица при 875 cm^{-1} , индикираща формирането на кристални НА на повърхността на стъклото е с висок интензитет при образците, дотирани със Ag_2O , което е основание да се предположи, че Ag^+ имат „катализираща” роля във формирането на НА. От анализа на получените FTIR спектри е заключено, че по повърхността на биостъклата се формира карбонат апатит В-тип (т.е. в апатитната решетка CO_3^{2-} йони са заместени с PO_4^{3-}). Изследваната морфология и картирането на образците със SEM-EDX потвърждава, че изследваните образци от биостъкла са *in vitro* биоактивни. Наблюдаваната повърхностна морфология на различните образци е различна, тъй като формирането на НА-слой е на различен етап при различните образци. С повишаване количеството на Ag_2O в състава на SGBG, се ускорява образуването на НА-слой. Данните, получени със SEM-EDX, за количествения елементен състав на повърхността на изследваните SGBG с (и без) добавки на Ag_2O показат, че

стойностите на отношението Ca/P+Si са около 1 и са резултат от формиране на „смес“ от кристален и аморфен НА на повърхността на образците, т.е. апатитът с отношение Ca/P=1,67 не е утаен и образуван.

Данните на рентгенофазовия анализ показват, че след престояване на получените композити в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни върху повърхността им кристализира НА с по-висока кристалност. Анализът на FT-IR спектрите показва, че по повърхността на композитите след *in vitro* теста за биоактивност, се отлага кристален карбонат съдържащ НА. Резултатите от разлагане на спектрите в интервала 1750-1350 cm⁻¹, в който се откриват ивиците на CO₃²⁻ йони показват, че се образува предимно В-тип CO₃НА, при който CO₃²⁻ йони са заменени с PO₄³⁻ (CO₃²⁻ → PO₄³⁻). Получените резултати показват, че композитните материали в системата 80биостъкло/20желатин проявяват повишена *in vitro* биоактивност в моделен разтвор. SEM изображенията на композити 80BG/20G, преминали теста за *in vitro* биоактивност в моделен разтвор показват, че на повърхността им е образуван кристален карбонат-съдържащ НА. Данните от EDX за количествата на основните компоненти на повърхностния слой, отложен върху повърхността на композитите с 2 и 4 wt% Ag₂O след престояването им 12 дни в разтвор на 1,5 SBF, показват че стойностите на отношението Ca/P+Si при образците с 2 и 4 wt% Ag₂O е равно на 1,67, т.е. получен е стехеометричен НА. Предполага се, че Ag⁺ биха могли да катализират процеса на нарастване на отлаганията от апатит.

Биологично охарактеризиране в *in vitro* условия на синтезираните биостъкла, съдържащи сребро и получените на тяхна основа желатин-съдържащи композити е проведено чрез различни, компетентно и целенасочено подбрани тестове с остеобластоподобни клетки, линия MG-63. За охарактеризиране на биосъвместимостта на синтезираните зол-гелни стъкла и желатин-съдържащи композити на тяхна основа е проучвана адхезията на MG-63 клетки върху тези материали. Установената добра адхезия показва, че добавянето на сребро-съдържащи BG в желатиновите композитни материали не оказва влияние върху клетъчната адхезия. За оценка на ефекта на стъклата и композитните материали върху остеобластните клетки е проведен МТТ анализ, позволяващ да се оцени преживяемостта на клетките и цитотоксичността на тестираните материали. Установено е, че третирането на клетките с BG0 и 80BG0/20G, в целия използван концентрационен диапазон, не води до промяна в преживяемостта на клетките, т.е. тестираните материали не са цитотоксични. Биостъклата и композитите съдържащи сребро, оказват цитотоксичен ефект в различни концентрационни интервали. От получените данни, е определена, т.нар. **летална доза 50 (LD50)** за стъклата и

композитите, съдържащи сребро. Поради цитотоксичния ефект, стъклата и композитите, в чиито състав е включено сребро не могат да бъдат използвани за създаване на биосъвместими материали в концентрации по-високи от LD50. По тази причина, всички последващи тестове, са осъществени с концентрации до $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BG0, BG1, 80BG0/20G и 80BG1/20G. Използвана е *имунофлуоресценция за F-актин и междуклетъчни контакти*, за оценка на ефекта на $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BG0, BG1, 80BG0/20G, и 80BG1/20G върху клетъчния растеж и морфология при по-продължително третиране на MG63 клетките, поставени в среда за остеобластна диференциация. След 3 дни на култивиране, не са наблюдавани цитотоксични отговори от страна на клетките: За да се оцени способността на стъклата BG0, BG1 и композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G да насърчават диференциацията и минаризацията в костната тъкан, е изследвана възможността MG-63 клетки да диференцират в остеостимулираща среда в присъствие на посочените образци чрез *Ализарин S оцветяване за минерализация*. Установено е, че минерализацията под въздействието на BG0 и 80BG0/20G е достоверно увеличена 2 пъти по отношение на контролата, в която минерализацията е обусловена само от остеогенната среда. При образците BG1 и 80BG1/20G се наблюдава тенденция за увеличаване на минерализацията в по-малка степен, т.е. експозицията със Ag^+ може по-скоро да насърчава, отколкото да компрометира остеогенната диференциация на MG-63 клетките. За да се установят промените в протеините, участващи в диференциацията на MG-63 клетките, е изследван Runx-2 (Runt-related transcription factor 2)- ключов транскрипционен фактор, свързан с остеобластната диференциация и остеокладин чрез *Имуно-блот анализ за Runx-2 и остеокладин*. Резултатите показват повишено количество на Runx-2 след 7-я ден от третирането с BG0, поддържано и на 15-я ден. При третиране на клетките с 80BG0/20G, Runx-2 се запазва висок до 21-я ден. Увеличението в белтъка Runx-2 е съпроводено и с увеличение на остеокалцина на 15-я ден за BG0 и още на 7-я ден за 80BG0/20G. Тези резултати показват, че BG0 и 80BG0/20G могат да предизвикат остеогенна диференциация.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд:

Представеният автореферат не отговаря на изискванията от ППНСЗАД на ХТМУ, РАЗДЕЛ II. Условия и ред за придобиване на образователната и научна степен „доктор”, **чл. 11. (5)** «Авторефератът трябва да съдържа *цели и задачи, използвани методи, получени основни резултати, изводи, заключения и списък на публикациите по дисертацията*». Автореферат трябва да бъде преработен, преди отпечатването му, съгласно цитираните

изисквания и критичните бележки, представени в т. Критични бележки на настоящата рецензия.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд:

Въз основа на получените резултати от проведеното изследване по темата на дисертационния труд, са формулирани научни приноси, които касаят биоматериалите, предназначени за приложение в костно-регенеративната медицина и могат да се обобщят по следния начин.

Синтезирани са нови зол-гелни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, дотирани с относително ниско съдържание на Ag_2O (до 4wt%). Проведеното за първи път пълно и систематично изследване на синтезираните биостъкла доказва наличието на кристални, биоактивни фази след термично третиране на образците при 600°C в продължение на 6 часа, които са предпоставка за тяхната потенциална *in vitro* биоактивност.

Получени са нови неорганични/органични композитни материали на основата на синтезираните биостъкла, съдържащи сребро и желатин, с потенциално приложение в костно-регенеративната медицина.

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

Стъклата и композитите, съдържащи сребро, оказват цитотоксичен ефект върху клетките от изследваната клетъчна линия (MG63) и не могат да бъдат използвани за създаване на биосъвместими материали, ако съдържащите се в тях концентрации на сребро са по-високи от $1\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Биостъклата и композитите, съдържащи до $1\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ag_2O стимулират клетъчната минерализация и остеогенната диференциация на MG-63 клетки.

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

Магистър фармацевт Димова се представя с 4 статии по темата на дисертационния труд, публикувани през 2017 год. Две от тях представляват обзорни статии за биоактивни стъкла и стъклокерамики в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и зол-гелни стъкла в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, отпечатани в българско списание Industrial Technologies (ISSN: 13149911) издавано от университет „Асен Златаров” гр. Бургас, в които докторантката е първи автор. Останалите 2 са отпечатани в Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR) (ISSN: 2454-1362), издание на Finlogy Publication, Индия), в които Димова е на 4 място. В едната статия се представят резултати от охарактеризиране на сребро съдържащи зол-гелни стъкла чрез FTIR анализ. В другата статия представя резултати от проведени FTIR и SEM

анализи на биоактивни композити желатин/сребро съдържащи зол-гелни композити. И двете списания, в които са публикувани статиите, са специализирани издания без импакт фактор.

Съгласно действащия към момента на зачисляване на Таня Димова като докторант правилник за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ, „...*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...*”. С представените по-горе публикации, посоченото минимално изискване е изпълнено.

Дисертантката е представяла научни съобщения на 12 национални и международни научни форума.

6. Критични бележки и коментари:

Най-напред ще представя критичните си бележки по отношение на представения **автореферат**:

1. Авторефератът трябва да съдържа *цели и задачи, използвани методи, получени основни резултати, изводи, заключения и списък на публикациите по дисертацията.*

2. Представеният автореферат е написан на 51 страници, съдържа 9 таблици и 16 фигури, както и списък с използвана литература от 287 източника. Поради изискването да се представят само *собствени резултати*, цитирания на чужди резултати и включването на списък с използвана литература е неуместно.

3. Дисертантката е приела буквално изискването за пълно съответствие на автореферата с дисертацията и е използвала подхода “copy-paste”, без да държи сметка за пропускането на някои фигури и таблици, водещо до редица недоразумения в текста:

-стр.15 “.....че композитните материали притежават приблизително еднакъв фазов състав с тези на SGBG (виж фиг. 13 и 15).» !?, но Фиг. 13 представя оценка на LD50 за стъкла и композитни материали след 24 часа третиране на MG-63 клетки, а Фиг. 15. - оцветяване с ализариново червено за минерализация на MG-63 клетки.

-стр.17 “....ИЧ спектри на изследваните материали са показани в Таблица 3” и «.....може да се предположи, че след разлагане на спектъра (Таблица 4).....”, в автореферата няма таблици с тези номера;

-стр.23 “....на ИЧ-спектри за SGBG (фиг. 2 и табл. 2) може да се обобщи, че ...”, но Таблица 2 представя SEM изображения на стъклата след термичното им третиране при 600 °C в продължение на 6 часа;

-стр.26 “....както се вижда от данните на табл. 22...», табл. в автореферата са само 9;

4. Прието е, авторефератът да отразява философията и целта на проведеното изследване, като представя ясно и стегнато основните и най-важни **собствени** резултати. За съжаление, има твърде силно застъпено позоваване на литературен опит, детайлно описание на чужди опитни постановки и резултати (включително и данни за използвано увеличение при SEM наблюдения). В същото време, пожелателно се посочва необходимостта от разлагане на комплексни абсорбционни ивици от представени ИЧ спектри. И без да се представят резултати от разлагането, се правят съществени изводи

5. Представеният автореферат се нуждае от значително подобряване на стила и стегнатост на изложението – има редица повторения, много паразитни изрази и излишни детайли.

Към представения **дисертационен труд** имам някои критични бележки, които са предпоставка и за препоръки към докторантката.

1. Органично-неорганичните композити (80BG/20G) между зол-гелни стъкла BG/Ag и желатин, са *получавани*, а не «синтезирани» (виж «Цели и задачи»;

2. В коментар към фиг. 3, представяща моделна схема на биоминерализация, се изяснява ролята на «*фосфорните йони*», които според мен са йони на фосфорната киселина, не на фосфора.

3. «LD50» е количеството материал, даден наведнъж, което причинява смъртта на 50% (половината) от група *опитни животни*. Според мен, по-правилно е при *in vitro* тест да се използва «IC50», тъй като тестът измерва цитотоксичност и съответства на концентрацията на веществото, която инхибира 50% от клетъчната популация.

3. В текста са въвеждани съкращения, описани вече в списъка на използваните съкращения. Допуснати са доста печатни грешки (изпускане на букви).

4. При дискусията по получените резултати е включено детайлно представяне на резултати и опитни постановки на други автори, което утежнява четенето и затруднява разграничаването на собствените резултати на дисертантката.

5. При представяне на списъка с използваната литература не е използван единен стил, има непълна библиография (лит. 78, 219), повторения (лит. 63 съвпада с лит. 65).

Представените критични бележки имат за цел подобряване на представянето на дисертационния труд и в никаква степен не омаловажават получените резултати.

7. Лични впечатления от дисертанта.

Не познавам дисертантката и нямам лични впечатления от нея.

8. Заключение:

Представеният дисертационен труд представлява напълно завършено научно изследване, в една сравнително нова, актуална интердисциплинарна област, съдържащ научни приноси в областта на материалите, предназначени за костно-регенеративната медицина. Работата е добре построена, използваната методология е правилна, получените резултати са адекватно анализирани. Широкият набор от използвани методи за физикохимично и *in vitro* биологично охарактеризиране на материалите, показва че дисертантката добре познава методите и правилно използва техните възможности.

Дисертацията отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и ППНСЗД на ХТМУ. Качествата на разглеждания дисертационен труд и изложеното в рецензията ми дават основание да изразя положително мнение и с убеденост да предложа на членовете на Научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен “доктор” на магистър-фармацевт Таня Неделчева Димова по научната специалност 5.10. Химични технологии (Технология на композитните материали).

София, 08.02.2019 г.

Рецензент:
/доц. д-р М. Симеонова/