

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури,
сформирано със заповед № Р-ОХ-211/20.04.2016 г.

на Ректора на Химико-технологичен и металургичен университет, София
за получаване за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор: **инж. Цветелина Георгиева Ангелова**

Научен ръководител: **доц. д-р Нели Георгиева**

Тема: **Антимикробни хибридни материали на базата на целулозни
производни с включени сребърни наночастици**

Рецензент: **проф. Мария Ангелова, дбн**

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

Инж. Цветелина Георгиева Ангелова е родена на 01.08.1988 г., а през 2007 завършва средното си образование в гимназия за чужди езици „Екзарх Йосиф” в гр. Ловеч. Дипломира се като инженер-биотехнолог (бакалавърска и магистърска степен) в катедра „Биотехнология” при ХТМУ, София, съответно през 2011 и 2012 г. В периода 2009 – 2011 г. придобива допълнителна специалност „Парфюмерийни и козметични продукти” отново в ХТМУ, София. Непосредствено с приключване на висшето си образование, Цветелина Ангелова спечелва конкурс и е зачислена в редовна докторантура по научна специалност с шифър 01.05.10 – Биоорганична химия, химия на природните и физиолого-активните вещества към катедра „Биотехнология” при ХТМУ, София. В продължение на 1 година работи като инженер-химик към секция „Липид-белтъчни взаимодействия” в Института по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН. За срока на докторантурата, Ангелова е положила всички изискуеми изпити с отлични оценки. Със заповед Р-ФХ-307 от 01.12.2015 г. е отчислена с право на защита, считано от 01.02.2016 г.

От макар и кратката научна биография на докторантката се вижда, че тя целенасочено се е образовала и специализирала в областта на биотехнологията и по-конкретно биоорганичната химия - създаване и охарактеризиране на биологично-активни вещества, полезни за здравето и бита на човека. В тази област е и докторантската теза на Ангелова, но сега тя навлиза в проблемите на нанотехнологията и разработването на наноструктури за медицината и екологията.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Според Световната здравна организация (СЗО) резистентността към антибиотици е една от трите най-големи заплахи за човешкото здраве през 21 век, наред със стреса и

климатичните промени. Този световен проблем, който се развива изключително бързо, не е предсказание за бъдеща заплаха. Той се случва сега, в момента и е причина за около 25 000 смъртни случая годишно в Европа и около 23 000 в САЩ. Специалистите предупреждават, че без спешни и съгласувани действия, светът върви към пост-антибиотичната ера, в която обикновените инфекции и леки наранявания, лечими в продължение на десетилетия, ще могат отново да убиват. Ето защо е необходимо да се търсят алтернативни способи. Сериозно значение се отдава на нетрадиционните антибактериални средства. В усилията за разработване на нови стратегии за борба с микробната резистентност се включват и нанотехнологиите, които предоставят иновативни решения и позволяват използването на различни антибиотични механизми. Нарастващ интерес предизвикват наночастиците от благородни метали, каквито са сребърните наночастици. Въпреки интензивните проучвания в научен и в приложен аспект, проблемът за създаване на ефективни сребърни наноструктури за медицината има редица нерешени въпроси, като напр. включването на органични и неорганични полимери, биосъвместимост на хибридните материали, физикохимични свойства, хидрофилно-хидрофобен баланс, цитотоксичност и др. В този аспект е и представеният дисертационен труд, а гореизложеното ясно очертава неговата **актуалност и перспективност**. Още повече, че основен акцент в дисертацията на Цветелина Ангелова е постигането на здравни и екологични ползи. Тук искам да подчертая и факта, че докторантката има шанса да разработи своята теза в катедра „Биотехнология“ при ХТМУ, в която изследванията в областта на хибридните наноматериали имат дългогодишна традиция. На базата на опита и постигнатото до сега, докторантката и научният ѝ ръководител определят основната теоретична насоченост на изследването – да се получат нови знания в нанотехнологията за създаването на хибридни материали с включени сребърни наночастици, проявяващи повишена антимикробна активност. В приложен аспект, дисертацията предлага нови материали за използване в медицината и биотехнологията. Получените резултати могат да бъдат използвани при разработване на нова стратегии за борба с антибиотичната резистентност на базата на нанотехнологиите.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 147 стандартни компютърни страници и е онагледен с 6 таблици и 98 фигури, по-голямата част от които са комплексни.

Литературният обзор представя възможно най-пълно и целенасочено съвременното състояние на проблема в световен мащаб. Включени са 206 литературни източници (1 на кирилица), почти 95% от които са публикувани след 2000 г. Отразени са

също постиженията в тази област от последните 4-5 години. В този смисъл, обзорът подчертава още веднъж актуалността на разработвания проблем, като доказва, че световната научна общност интензивно се занимава с него. Отдадено е внимание и на българският опит в този аспект, цитирани са и резултати на катедрата, подчертавайки съвременното ниво на изследванията в нея. Разделът прави много добро впечатление с начина на поднасяне на информацията, с пречупване на отдавна известното през призмата на съвременните насоки на изследване, с широкия диапазон на нова информация, съответстваща на основната насоченост на докторантската теза. Всичко това е указание, че Цветелина Ангелова познава много добре постиженията и нерешените въпроси в тази област.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация, касаеща създаване и охарактеризиране на хибридни материали на основата на различни целулозни етери и тетраетилортосиликат с включени сребърни наночастици по отношение на тяхната активност да спират или подтискат развитието на бактерии, дрожди и плесени, както и образуването на биофилми. За нейното реализиране са формулирани 5 взаимно обвързани и логически следващи задачи.

Разделът **"Материали и методи"** демонстрира широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, химични, биотехнологични, микробиологични, биохимични и др. Заслужава да се подчертае използването на методи за синтезиране на хибридни материали с включване на метални наночастици, структурен анализ на получените наноматериали, сканираща и трансмисионна електронна микроскопия, атомно-силова микроскопия, ВЕТ и микросондов (EDS) анализи, измерване на статичен контактен ъгъл, софтуерни програми. Освен това, методите са представени разбираемо, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Някои от тях са илюстрирани със цветни схеми, което спомага за тяхното коректно възприемане. Експериментите са проведени със съвременна апаратура.

В раздел **„Резултати и дискусия“** е включен обширен експериментален материал, който се характеризира с логическа последователност. Отделните етапи са разработени обстойно, в съответствие с поставените задачи, придавайки на дисертацията характеристика за цялостност. Докторантката представя подробно създаването на хибридните материали по зол-гелния метод на базата на SiO_2 /целулозни производни с включени сребърни наночастици, след което провежда анализи за охарактеризирането им. В съответствие с изискванията към свойствата на такива структури, Ангелова

използва различни съвременни методи и апарати. Сканираща електронна микроскопия и EDS анализ на хибридни материали с различна концентрация на сребро дават информация за тяхната морфология, а с помощта на трансмисионна електронна микроскопия, докторантката установява формата и размерите на включените сребърни наночастици. Други важни характеристики на новите структури като специфична повърхност, обем и размер на порите, както повърхностната топография са определени с BET анализ и атомно-силова микроскопия. Получени са данни и за хидрофобните/хидрофилните им свойства. Трябва да се отбележи, че всички анализи са интерпретирани на базата на съответните контроли.

В следващия етап, докторантката проучва биологичните свойства на създадените наноматериали. Проведени са микробиологични изследвания с най-добрите варианти, съдържащи различна концентрация на сребърни наночастици по отношение на тяхната антибактериална и антифунгална активност. Като тест микроорганизми са използвани прокариоти (*Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*) и еукариоти (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus niger*). Установени са важни характеристики като инхибиране на растежа и развитието на бактериите, дрождите и филаментозни гъби, редукция броя на клетките, образуващи колонии, зависимостта от времето на въздействие и концентрацията на сребърните наночастици. Особено значими са изследванията с мицети, тъй като на пазара лекарствените средства за третиране на подобни инфекции са изключително малко. Доказано е фунгицидно и фунгистатично действие, като ефект от параметрите на въздействие и вида на изпитваните щамове.

Искам да отбележа и подразделът, в който докторантката е отделила внимание на ефекта на новите наноматериали върху образуването на биофилми от *Pseudomonas aeruginosa* - причинител на остри и хронични инфекции. Стратегиите за борба с биофилмите включват възпрепятстване на образуването им или тяхното разграждане. В тази посока са и усилията на инж. Ангелова, която характеризира получените хибридни структури по отношение на възможността им да инхибират формирането на биофилми и въздействието им върху адхезионната способност на бактериите. Експериментите са проведени с SiO_2/HPMC и SiO_2/HPC , съдържащи покачващи се концентрации сребърни наночастици. Резултатите демонстрират ефект върху способността на бактериите да се прикрепят към повърхността на материала, разпределението на клетките в него и редукцията на размерите на биофилма.

В съответствие с логиката, определена от предварителната схема на експерименталната работа, последната серия експерименти дава информация за:

➤ цитотоксичността на хибридните наноматериали и тяхната биосъвместимост. Установена е 90-100% преживяемост на клетките от клетъчна линия 3T3 миши фиброласти, т.е. среброто, включено в хибридни структури, не оказва цитотоксично действие върху тях.

➤ ефекта на хибридните структури върху цитоскелета на същите фибробласти. Докторантката доказва, че организацията на актиновия скелет и клетъчната адхезия зависят от концентрацията на сребърните наночастици.

С това дисертацията дава заявка за оригинални приложни приноси в медицината и фармацията.

Искам да отбележа, че в раздел „Резултати и дискусия”, едновременно с коректното отразяване на получените данни е представена и много убедителна дискусия на базата на литературата от последните години. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема, задълбочената научна разработка и компетентната научна среда, в която е реализирана. Много добра идея е представеното в края на дисертацията „Обобщение”, което дава възможност на читателя много точно да се ориентира в разработката и да възприеме постиженията в нея.

Искам със задоволство да подчертая отличното оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Съдържанието на автореферата отразява коректно получените резултати, изводите и приносите на дисертационния труд.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд;

Приемам и формулировката на приносите и искам да подчертая по-важните от тях, а именно:

1. Получени са сребърни наночастици с различни размери.
2. За първи път са създадени хибридни материали на базата на SiO_2 /целулозни етери с различно съдържание на сребърни наночастици.
3. Наличието на покачващи се концентрации сребро в хибридните материали води до уплътняване структурата на материалите, промени в повърхностната грапавост,

повишаване на антибактериалните свойства и редуциране дебелината на формацията се биофилм.

4. Създадените хибридни материали проявяват висок биологичен ефект спрямо тест култури на прокариотни микроорганизми. Наблюдава се по-висока чувствителност при Грам-положителните бактерии в сравнение с Грам-отрицателните, дължаща се на структурните особености на клетъчната стена.

5. Високото съдържание на сребро в хибридните материали има силно инхибиращо действие спрямо еукариотни микроорганизми: предизвиква морфологичен диморфизъм при *Candida albicans* и инхибиране процеса на спорулация при *Penicillium chrysogenum*.

6. Повишената концентрация на сребро в новите наноструктури води до по-висока цитотоксичност и по-слаба способност на клетките да адхезират върху хибридите без да се наблюдават морфологични изменения.

7. Получените резултати могат да бъдат принос към разширяване на знанията в областта на актуален проблем със здравни и екологични аспекти.

8. В приложен аспект, получените данни могат да бъдат база при разработване на стратегии за борба с антибиотичната резистентност на бактерии и мицети.

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

Данните от дисертацията са включени в 3 научни статии и 18 участия в научни форуми (3 международни и 15 национални). Всички статии са журнални, една е отпечатана в списание с IF (Biotechnol & Biotechnol Eq) и две в списание на ХТМУ. В 3 статии и 8 доклада Цветелина Ангелова е на първо място. Това ми дава основание да считам, че дисертацията основно е дело на докторантката.

Освен това, Ангелова е член научен колектив при разработването на 2 проекта: 1 проект по оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” и 1 проект, финансиран от Фонд „Научни изследвания” при МОН. Тя е участвала в лекционен курс в Болоня, Италия по програма Erasmus Mundus. Всичко това несъмнено е допринесло за повишаване квалификацията и опита на инж. Ангелова при оформянето ѝ като млад учен.

6. Критични бележки и коментари

Искам да отбележа, че докторантката е взела пред вид повечето от моите забележки на апробацията. В допълнение може да се добави следното:

1. Много полезно би било в раздел „Литературен обзор“ да се подчертае новото в разработката. Макар, че за специалистите това е ясно, един заключителен пасаж би улеснил читателите.

2. В раздел „Материали и методи“ не е отбелязана концентрацията на бактериалната суспензия при отчитане на CFU и инхибиране на растежа (стр. 53). Подобен пропуск се вижда и при отчитане на антигъбното действие по агар-дифузионния метод. Обръщам внимание на това, защото изходната концентрация на микроорганизмите е от съществено значение за резултата в такъв род експерименти.

3. На стр. 54 (антигъбно действие посредством контакт) е отбелязано, че върху покривно стъкло с нанесен хибриден материал се поставя **спора** от *A. niger*..... Вероятно е техническа грешка, тъй като за да се постави само 1 спора се изисква специализирана техника и съответен инструмент (микроманипулатор), а такъв не е отбелязан.

Посочените забележки са по-скоро от техническо естество и не намаляват стойността на дисертацията. Отбелязвам ги с презумпцията да бъде полезна за бъдещата работа на Цветелина Ангелова.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Имате ли информация кой е механизмът, по който новите хибридни материали инхибират растежа на тест микроорганизмите и редуцират формирането на биофилми?

2. Като се има пред вид постигнатото в настоящата разработка и нерешените въпроси по проблема, в каква насока трябва да продължат изследвания?

7. Лични впечатления за докторанта

Не познавам лично докторантката, но от представения дисертационен труд и от апробацията останах с впечатлението, че тя е получила сериозна професионална и методическа подготовка.

8. Заключение

Представеният материал е дисертабилен, разработена е много актуалната тема, която предлага иновативни наноматериали за приложение в медицината и биотехнологията. Експериментите са поставени методично правилно, а получените резултати са достоверни и доказват тезата на дисертацията. Те могат да бъдат използвани при създаване на нови стратегии за борба със световния проблем на антибиотичната резистентност. По време на докторантурата, Цветелина Ангелова е усвоила голям брой съвременни методи, придобила е умения за работа с модерна апаратура и това е

повишило нейната квалификация. Безспорно представената дисертация е база за следващи научни и приложни разработки.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, **убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури**, сформирано със заповед № Р-ОХ-211/20.04.2016 г. на Ректора на Химико-технологичен и металургичен университет, София да присъдят на **инж. Цветелина Георгиева Ангелова образователната и научна степен “доктор”**.

16. 05. 2016 г

София

Рецензент:

/проф. М. Ангелова, дбн/