

РЕЦЕНЗИЯ

от доктор на науките **Илия Благоев Рашков**, чл.-кор. на БАН, професор в Лаборатория по Биологично активни полимери при Института по полимери на Българската академия на науките на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика, информатика професионално направление 4.2. Химически науки, (Химия на високомолекулните съединения)

Предмет на рецензиране

Със заповед № ВО 38-441 от 15.07.2013 г. на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ съм определен за член на научното жури по процедура за защита на дисертационния труд на редовен докторант **Силвия Станимирова Симеонова** на тема **„ПОЛУЧАВАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ БИОМАТЕРИАЛИ ОТ БИОРАЗГРАДИМИ ПОЛИМЕРНИ СМЕСИ“** за придобиване на ОНС „доктор“ с научен ръководител: проф. дн **Михаил Евстатиев**.

1. Кратки биографични данни

Силвия Станимирова Симеонова, родом от гр. Елин Пелин завършва Химическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ (бакалавър 2004 г., и магистратура по полимери 2006 г.). Работи последователно във „Вайс Профил“ ООД (лаборант, 2006) и в Института по полимери на БАН (химик, 2008). Редовен докторант във Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Кл. Охридски“ от 2009 г.

2. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Получаването и охарактеризирането на нови биоразградими влакнести материали и композити от тях е една бурно развиваща се област, която получи нов тласък с развитието на някои модерни технологии за получаване на микро- и наноразмерни материали. Промислеността възлага големи надежди на този тип материали. Очаква се те да намерят приложение в медицината (инплантология, възстановителна хирургия, терапия и диагностика), в агрофармацията и в т.нар. „активни“ опаковки за храни. Тези материали трябва да са с висока биологична поносимост, която да бъде съчетана с подходящ дизайн на изделията, изработени от тях. Тяхната ниска цитотоксичност е от особена важност, когато те са предназначени да играят ролята на „скеле“ (*англ.* scaffold) при тъканното инженерство, за да се осигури възможност за пролиферация и нормално развитие на клетките. Тези материали е необходимо да имат и още едно забележително свойство – да бъдат биологично разградими, и още по-добре - биологично резорбируеми. Биологичната разградимост е от особено значение и при конструирането на екологично съобразни опаковки. Представеният ми за рецензиране дисертационен труд съответства на това актуално научно направление.

3. Оценка на структурата, задачите и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд (общо 166 стр.) включва „Литературен обзор“ (46 стр.), „Цел и задачи“ и „Материали и методи“ (общо 28 стр.), „Резултати и обсъждане“ (общо 63 стр.). При разработването на труда са използвани 324 литературни източници, 47 % (153) от тях са отпечатани през 2000 или след тази година.

Основна цел на дисертацията е „получаване и охарактеризиране на нови биоматериали от полимерни смеси, на основата на модифицираната концепция на усилените микрофibrилни композити [micro fibril composites (MFC)]”.

Усилени микрофibrилни композити са получени от Ст. Факиров и М. Евстатиев през 1992 г. и продължават да бъдат изследвани интензивно. Тези полимерни композити са изградени от изотропен полимер - матрица (например от полипропилен), усилен с хомогенно диспергирани микро- или нанофibrили (например от полиетилентерефталат) с високо съотношение на дължината им спрямо тяхната дебелина. Новото в дисертационния труд е заместването на неразградимия полиетилентерефталат с биоразградим полиестер (поли-L-млечна киселина) и на полипропилен - с поли(етилен-съ-винилов алкохол) или поли(бутиленадипат-съ-терефталат). Използването на тези полимери е напълно целесъобразно и е в съответствие с поставените задачи. Получаването, изолирането и охарактеризирането на фибрилите е една от основните задачи, заедно с получаването на композитите. На дисертантката е поставена и задачата, съвместно с биолози да проведе и предварителен скрининг (*in vitro* и *in vivo* на плъхове) за оценка на потенциалната възможност за приложение на тези материали.

По необясними за мен причини частта, озаглавена „III. Получаване на усилен микрофibrилни композити (MFC) от биоразградими PLA/Ecoflex смеси“, е поставена в дисертацията след литературните източници (153 стр. –165 стр.). Смятам, че мястото на тази част е в раздел „Резултати и обсъждане“.

5. Оценка на съответствието на използваните методи.

В дисертацията са използвани широк набор от методи за изследване на състава и свойствата на фибрилите и композитите, добре съобразени с експерименталните задачи. Дисертантката показва добро познаване на методи като диференциална сканираща калориметрия, ретгеноструктурен анализ, ИЧ спектроскопия, сканираща електронна и атомно-силова микроскопия, хроматография. Физикомеханичните изпитания са проведени на модерна апаратура (UMT-2M, Bruker Germany). Всички тези методи са описани подробно, дадени са и обяснения за физичната им същност, което прави добро впечатление. Този материал може да послужи на бъдещи стажанти и докторанти. Сполучливо подбраният комплекс от методи създава предпоставки за задълбочено проучване и успешно решаване на задачите. Описани са и биологичните тестове.

6. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултатите и изводите

Литературен обзор.

В литературния обзор е направено ретроспективно разглеждане на развитието на биоматериалите. Разгледани са и техниките за получаване на порести тримерни подложки за тъканно инженерство (стр 28, таблица 2). Какви са причините да не бъде включена и разгледана една от най-обещаващите техники – електроовлажняването? Добре би било да бъде направено и кратко критично разглеждане на предимствата и недостатъците на тези техники. Тъй като в изложението има някои непълноти в дефинициите за биоразградимост и биорезорбируемост, позволявам си да направя следните пояснения (съгласно възприетото в литературата - D Eglin and M Alini, Degradable polymeric materials for osteosynthesis, European Cells and Materials, 16: 80-91 (2008).

*„Материалът може да бъде определен като биоразградим, ако се разгражда *in vivo*, но без доказателство за неговото елиминиране от организма. Един материал показва преференциално ерозия на повърхността или ерозия в обема в зависимост от присъщите му свойства (дифузия на вода и скорост на разграждане) и от неговия размер. Такива фрагменти могат да бъдат отнесени от мястото на имплантиране, но не непременно от тялото. Един материал се нарича*

биорезорбируем, когато той се разгражда и по-нататък се резорбира *in vivo*. Продуктите на разграждане на полимера се елиминират чрез естествените пътища или поради проста филтрация или след техния метаболизъм. Биорезорбирането е концепция, която отразява пълното елиминиране на изходния чужд материал и всички вторични продукти (нискомолекулни съединения). Следователно, биоразградимият полимер не е задължително биорезорбируем. Накрая, материал е биоабсорбируем, ако може да се разтваря в телесните течности без молекулно разграждане. Материалът след това се екскретира”.

В литературния обзор са разгледани и получаването и свойствата на използваните полимерни материали: поли(L-лактид), съполимерите – поли(етилен-съ-винилов алкохол) и хитозан (поради наличието на *N*-ацетилглюкозаминни звена той също представлява съполимер). Обръщам внимание, че при коректното изписване на названията на съполимерите „-съ-“ се изписва в курсив. В частта, описваща свойствата на хитозана, има неточни и дори неверни твърдения (стр. 40). Хитозанът е неразтворим във вода (при стойности на рН равни или по големи от 7), а не слабо разтворим (изключение правят само някои олигомери с молна маса под 3000). Хитозанът се разтваря в присъствие на монокарбоксилни киселини (оцетна – най-често използваната), с ди- и трикарбоксилни киселини образува физични мрежи (например с лимонена). Хитозанът няма действие подобно на молекулните сита.

В един софийски университет (ХТМУ, проф. М. Кръстева) и в един Институт на БАН (Института по полимери, проф. Н. Манолова, проф. Л. Минкова и доц. Е. Недков) от години се провеждат изследвания в областта на биоразградимите полимери [поли(L-лактид) и хитозан]. Резултатите са публикувани в международни списания с импакт фактор (само работите на проф. Манолова в тази област са цитирани над 1500 пъти) Може само да се съжالياва, че нито една публикация на български автор не е намерила място в литературния обзор на докторантката.

Резултати, обсъждане и изводи

Получените по-важни резултати могат да бъдат обобщени както следва:

- Получени са микрофибрилни композити от и поли(етилен-съ-винилов алкохол) и са оптимизирани условията за изолиране на микрофibrилите от поли(L-лактид) чрез екстракция на матрицата от поли(етилен-съ-винилов алкохол) със смес вода-пропанол при 85 °С.

- Определени са структурата и надмолекулната организация на получените PLLA/поли(етилен-съ-винилов алкохол) влакна чрез термично, структурно, химично, морфологично и механично охарактеризиране със съвременни физикохимични методи.

- Концепцията за усилените микрофибрилни композити е приложена и за получаване на композити от поли(L-лактид) и алифатно-ароматния съполиестер поли(бутиленадипат-съ-терефталат), известен под търговското наименование Ecoflex® (BASF, Germany). С помощта на сканираща електронна микроскопия е показана фибрилната структура на тези композити [фibrили от поли(L-лактид) в матрица от Ecoflex®]. Получени са и са охарактеризирани композити с подобрени механични и бариерни свойства. Предполага се, че те могат да намерят приложение за изработка на биоразградими опаковъчни материали в хранителната промишленост.

- Проведен е предварителен скрининг (*in vitro* и *in vivo*) на някои от композитните материали (съдържащи хидроксилапатит), който дава обнадеждаващи резултати по отношение на потенциалната възможност за приложимостта им за реконструкция на костни дефекти.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд. Лично участие на автора

Докторантката е съавтор на **2 публикации, отпечатани в международни списания** с импакт фактор (**S. Simeonova, M. Evstatiev, W. Li, T. Burkhart, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 2013, IF 2.221** и **M. Evstatiev, S. Simeonova,**

K. Friedrich, X.-Q. Pei, P. Formanek, *Journal of Material Science*, 2013, **IF 2.163**) и на **едно съобщение**, отпечатано в сборник от научна конференция на Факултета по ветеринарна медицина към Лесотехническият университет (**S. Simeonova**, V. Nanev, P. Dimitrov, I. Vladov, M. Alexandrov, M. Gabrashanska, E. Dyulgerova, M. Evstatiev, Proceedings of the Scientific Conference with International participation, University of Forestry, Faculty of Veterinary medicine, 2012). На две от тези публикации докторантката е първи автор, на една - втори автор. Публикациите в списанията с импакт фактор носят елементи на новост и са преминали бариерата на независимите рецензенти и на редакционната колегия и за мен са от решаващо значение за оформяне на моята положителна оценка.

Резултатите от дисертационния труд Симеонова докладва (първи автор) в **10 устни съобщения** на конференции в България и в **8 постера** (първи автор), от които 2 са представени в чужбина.

Част от изследванията са финансирани от един национален и един университетски проект, в които докторантката е участник.

8. Автореферат

Авторефератът правилно отразява резултатите от дисертационния труд. В автореферата дисертантката се е постарала да отстрани голяма част от допуснатите технически грешки в дисертацията и по тези причини ще се въздържа да ги изброявам в рецензията.

9. Критични забележки, въпроси и препоръки

Имам следните критични забележки:

- (1) стр. 17 – „молекулното тегло на материалите“ е неправилен термин.
- (2) стр. 48 – не е посочен размерът на използваните хидроксилапатитни частици
- (3) стр. 97 - на фиг. 42 не са посочени стандартните отклонения при определяне на диаметрите на фибрилите (и в следващи хистограми, напр. фиг 65)
- (4) стр. 98 в израза „...**Подобна архитектура е регистрирана при фибрили, получени чрез електропредене...**» има две недопустими неточности. Неправилно е да се използва „електропредене“; правилният превод на български на термина „electrospinning“ е „електроовлакняване“. Освен това при електроовлакняването се получават микро- или нановлакна с дължина, надвишаваща десетки метри. Затова е редно да се обоснове използването на термина „фибрила“ и да се обясни разликата между влакно и фибрила. Въпросът за дължината на фибрилите, получени в дисертацията остава открит.
- (5) стр. 98 - въз основа на SEM микрографиите [фиг. 43 (A и B)] се твърди, че „...на повърхността на PLLA подложката се наблюдава **плътен** апатитен слой... “. Този плътен слой няма ли да бъде препятствие за навлизането на клетките в обема на подложката (scaffold)?
- (6) стр. 119-123 при подложките от PLLA, чиито пори са формирани вследствие на разтваряне на частиците от включен NaCl – безспорно е, че порите в полимерната матрица са резултат от този процес – порите копират формата на кристалите NaCl (кубични, фигури 60, 62, 64). Остава открит въпросът доколко те са взаимосвързани и възможно ли е в тях да проникнат клетки? Разполагате ли с такава информация?

10. Лични впечатления

Познавам докторантката от нейната магистратура (2004/2005 уч. год), както и от работата ѝ в Института по полимери. Останал съм с впечатление, че тя е млад изследовател със значителни интелектуални възможности и с желание да се усъвършенства. Тези впечатления се потвърждават и от публикационната ѝ дейност под ръководството на проф. Евстатиев. Искам да обърна внимание, че независимо от участието на немски съавтори „концепцията за усилените микрофибрилни композити“

е една българска идея, успешно развивана от двама българи (Факиров и Евстатиев), единият от които е работил успешно с дисертантката в тежките български условия.

11. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Позволявам си да препоръчам изследванията да продължат в насока изследване на възможностите на усилените микрофибрилни композити за получаване на нови биоразградими опаковъчни материали. Проблемът за получаване на такива композити изцяло от биоразградими полимери, получени от възобновими източници, е едно предизвикателство. Решаването на този проблем интересува изследователите от цяла Европа и е от съществено значение за опазването на околната среда. Решението може да бъде намерено по твърде елегантен начин като се използват огромните възможности за регулиране на степента на кристалност на стереосъполимерите на млечната киселина и нейните стереокомплекси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научноприложни и приложни резултати, които представляват оригинални приноси в областта на полимерните композити и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му, Правилника на СУ „Св. Климент Охридски“ и препоръчителните изисквания на Факултета по химия и фармация. Дисертантката има задълбочени знания и професионални умения в областта на физикохимията на полимерните материали. Тя демонстрира умения за провеждане на изследвания за получаване на материали с участието на биологично разградими полимери и охарактеризирането им със съвременни физикохимични методи. Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване и предлагам на почитаемото Научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Силвия Станимирова Симеонова.

София, 15.10.2013 г.

И. Рашков