

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на

ас. КОНСТАНС ЕМИЛОВА РУСЕВА

на тема **„Интелигентни полицвитерйонни материали с приложение като превръзки за хронични рани”**,

представен за присъждане на образователната и научна степен
**„Доктор“ по професионално направление
4.2. - Химически науки (Полимери)**

Рецензент: проф. Георги Стефанов Георгиев, дхн

Научна специалност: Полимери (Синтез, Полиелектролити, Биополимери, Математично моделиране)

Адрес за контакти: София-1164, бул. „Джеймс Баучер” №1, Факултет по Химия и Фармация, Софийски Университет „Свети Климент Охридски”

Мейл: ohogg@chem.uni-sofia.bg, Тел.: 02/8161685

1. Кариерен профил

Ас. К. Русева е зачислена като редовен докторант по професионално направление 4.2. – Химически науки (Високомолекулни съединения) на 01.02.2016 г., а е отчислена като задочен докторант на 01.03.2019 г. (с право на защита) със съответни заповеди на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски” (РД-20-128 от 19.01.2016 г. и РД-20-763 от 01.03.2019 г.). Защо като задочен? Защото през този период ас. Русева не само полага успешно (с отлични оценки) необходимите изпити по специалността и чужд език, но и спечелва конкурс за асистент по полимери към ФХФ на СУ „Св. Кл. Охридски”. От месец октомври 2018 г. тя заема тази длъжност като докторантурата и се трансформира в задочна.

Колежката Русева завършва езикова гимназия в гр. Пазарджик през 2006 г., магистратура по химично и биохимично инженерство в ХТМУ-гр. София през 2012 г. След това работи като медицински търговски представител в две чуждестранни фармацевтични фирми с представителства в София (Savex Pharma, Phoenix Pharma) до 2015 г. През 2016 г., след конкурс, е зачислена като докторант по посочената по-горе тема с ръководители доц. д-р Е. Василева и проф. д-р А. Апостолов. Част от работата по дисертацията е извършена във Висше училище по индустриална химия и физика в Париж (4 месеца), Лайбниц институт по полимерни изследвания в Дрезден (половин месец) и в Политехнически университет на Каталуня в гр. Тераса, Испания (5 месеца). Резултатите от дисертационния труд са предмет на 2 публикувани и 1 представена за печат публикации в специализирани международни полимерни списания, на 1 заявка за патент от месец март 2019 г., на 16 съобщения и доклади на национални и международни конференции и семинари, както и на отчети на 5 научни проекта (4 национални и 1 европейски).

2. Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е с обем 105 страници и съдържа 24 схеми, 38 фигури, 6 таблици. Таблица с номер 5 липсва. Използвани са 98 литературни източника, по-голямата част от които (71) са публикувани през настоящия век. Структуриран е традиционно: увод (1стр.), литературен обзор (33 стр.), цел и задачи (1 стр.), експериментална част (18 стр.), резултати с дискусия (40 стр.), изводи (1 стр.), съдържание (4 стр.). Приложени са списъци на научните публикации, на изявите на научни форуми, на специализациите и участията в научни проекти, на използваните съкращения.

Темата на дисертационния труд му отрежда място във все по-задълбоченото опознаване физикохимията на полицивтерйонните (ПЦЙ) разтвори и мрежи и все по-разширяващото се тяхно биомедицинско приложение. Това е актуално научно направление. Тази моя позиция отразява бурното нарастване на броя на научни публикации, обзори и монографии по тази тематика, както и от резултатите на проведени изследвания в лаборатория Водоразтворими полимери, полиелектролити и биополимери по ПЦЙ като ензимни ренатуратори - шаперонини, контролиран имунен отговор при взаимодействие на ПЦЙ с С1q-комплекс и възможното му приложение за стабилизиране и забавяне симптоматиката на автоимунно заболяване, насочен транспорт на серия лекарствени субстанции, ефективна повърхностна модификация на херниални мрежи, туширане адсорбцията на еритроцити на модифицирани с ПЦЙ повърхности. Това генерира интерес към обсъжданата работа, а и очакване за по-бързо и успешно внедряване на ПЦЙ материали в едно както актуално, така и по-разработено и на пръв поглед, с по-ясен и кратък път „изследване – приложение като активен материал за превръзки на хронифицирани рани (ХР)”. Дано очакването се сбъдне. Заложената в основата на работата идея се основава на установени характеристични особености на ПЦЙ водни разтвори и хидрогелове (антиполиелектролитен ефект, липса на ефект на Донан, спинодално фазово разделяне на водни ПЦЙ разтвори, диполен (векторен) характер на част от йонното взаимодействие). Към това в работата е добавена обратимата рН-зависима трансформация „поликатион-полицивтерйон” на поликарбосибетаините (ПКБ), нашумяла в последно време с приложението на обратимото взаимодействие на ПКБ с ДНК при генно-терапевтични процедури. Обект на изследване са

ПЦЙ мрежи, при които освен горепосочените фактори, се „разиграва“ колкото любопитно и интригуващо, толкова и обещаващо при умело боравене с него смесено (хибридно) химично и физично (йонно) омрежване. При това йонното омрежване е не само функция от съотношението „химични възли / концентрация и степен на йонизация на цвистерйоните“, но и от разпределението на цвистерйоните между вътрешномакромолекулни и междумакромолекулни цвистерйонни формирания. Междумакромолекулните цвистерйонни клъстери (природата на физичните възли) са само част (с възможен контрол) от тези формирания. Картината става още „по-богата“, ако се отчете и хидрофобния характер на основните полимерни вериги. Винаги ли те остават пасивни („обвити“ с хидрофилните странични вериги) или при достигане на определено йонно насищане техни фрагменти се „освобождават“ и взаимодействат между подобни или други хидрофобни субчастици? Ето така изглежда отчасти „пъстрата“ картина на изследваните ПЦЙ мрежи от физикохимична гледна точка.

Завидна е дързостта на колежката К. Русева, посветила време, сили и интелект за да докаже възможността за приложение на този сложен и динамичен мрежов конгломерат като активен материал за превръзки на ХР. Основанията за дързостта и са разбираеми: набъбване на ПЦЙ мрежи в солевия ексудат на раната, доказаните по-рано биосъвместимост на същите, туширане на протеинова и клетъчна адхезия на ПЦЙ повърхности, контролирана механична якост на ПЦЙ мрежи, пренебрежима цитотоксичност. За да докаже тази възможност на ас. К. Русева се налага да разшири химичната и биотехнологичната си култура със знания и опитност по ензимология, клетъчна биология, патоанатомия, патофизиология.. Изследването е междудисциплинарно, което го прави трудно, интересно и може би - обещаващо.

Оригинална ли е разработваната в дисертацията идея за приложение на ПЦЙ материали за лекуване на рани? За съжаление, не. Началото е поставено от група китайски колеги [Liu и сътр.] през 2012 г. Използвали са електроопределен полисулфобетайнов (ПСБ) мат в с добавено сребро за превръзки на силноексудиращи рани. Доказани са очаквани предимства на тези превръзки пред използваните дотогава. Друг колектив от китайски колеги [Wu и сътр.] в две публикации (2018 г. и 2019 г.) са използвали като активен материал за превръзки на рани ПСБ хидрогел. Проведените са *in vivo*-изпитания и са получени насърчителни резултати. Колежката К Русева коректно приема оригиналния принос към идеята на посочените, а и на други, цитирани в дисертацията, китайски колеги и претендира за оригинален принос на приложението на ПЦЙ хидрогелове като **активен материал за лечение на ХР**. Степента ми на информираност по този проблем сега не ми позволява еднозначно да подкрепя или да не се съглася с тази претенция.

С безспорна оригиналност обаче е идеята за получаване, изпитания и възможно приложение на хидрогелове на взаимнопроникващи ПКБ/ПСБ като активен материал за превръзки на рани. Най-малкото защото се обогатява „палитрата“ от ефективни управляващи параметри за ефективността на това приложение: рН, Т, масовото отношение на двете ординарни мрежи, концентрациите на омрежващия агент при синтеза на двете мрежи. Това очертава алтернатива на изпитваните досега композити на ПЦЙ мрежи с различни както пасивни, така и функционализиращи пълнители.

3. Постижения на дисертационния труд

1. Събраната и анализирана литературна информация за приложението на ПЦЙ хидрогелове като активен материал за превръзки на рани.

2. Обогатяването на автор (а и на читател) в резултат на изминаването на дългия път от синтез на мономер, хомополимер и полимерни мрежи, тяхното физикохимично охарактеризиране и медикобиологични изпитания с цел доказване на възможността да бъдат активен материал за лечение на ХР.

3. Разкритата разлика между ПСБ и ПКБ мрежи и хидрогелове, започвайки със синтеза на съответните мрежи (раздел IV.1.2.) и завършвайки с липста на зависимо от температурата фазово разслояване на ПКБ водни разтвори, както и с противоположния ход на зависимостите

на равновесната степен на набъбване (РСН), на микротвърдостта на двата типа мрежи, както и на модула на еластичност на двата вида хидрогелове с РСН от концентрацията на омрежващия агент (съответно фигури 28, 30 и 29).

4. Формулираната и посочена по-горе обещаваща идея за изпитване на хидрогелове на взаимнопроникващи ПКБ/ПСБ мрежи като активен материал за превръзка на рани. Резултатите от проведените изпитания на една такава мрежа (макар и с неопределено масово отношение на двете ординарни мрежи), са представени на фигури 33-38.

5. In vivo доказаната биосъвместимост (според критерии на ISO 7405) на ПСБ и ПКБ хидрогелове, имплантирани по общоприета методика в мишки (фигури 25-27).

6. Доказателството, че ПСБ хидрогелове не провокират клетъчна смърт на миши ембрионални фибробластни клетки, както и ниската биоадхезия на тези клетки върху повърхността им (фигури 21, 22). Липсата на подобно изпитание за ПКБ поражда недоумение.

7. Доказаната антибиофилмообразуваща способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове спрямо три, характерни за ХР, бактериални щама (фигури 23, 24).

8. Демонстрираните значително по-големи стойности на степените на набъбване на ПСБ мрежи в симулирана тъканна течност в сравнение с тези във вода в температурния интервал от 30 до 45°C (фигури 7, 8).

9. Сравнението между набъбването на ПСБ и ПКБ мрежи във физиологичен разтвор с тези на използвани за лечение на ХР материали за превръзки (Aquacell Ag Extra, Allevyn, Durasoft), както и между тяхната способност да прилепват към имитиращ рана материал (фигури 9, 10). Сравнението демонстрира предимства на ПСБ и ПКБ хидрогелове.

10. Успешното абсорбционно имобилизиране на Subtilisin DY в ПСБ и ПКБ хидрогелове с цел ускоряване разграждането на некротизиралата тъкан в ХР (фигура 31). Доказаната възможност за многократно използване на имобилизиращия ензим чрез 6-циклово изпитание (фигура 32).

11. Ниските стойности на ъгъла на загубите (и на неговия тангенс) на ПСБ и ПКБ хидрогелове с РСН (фигури 3, 4) и неговото рязко намаляване с увеличаване концентрацията на омрежващия агент.

4. Лични приноси

Познавам колежката К. Русева като деятелен и толерантен колега. Мнението ми е, че голямата по обем и много разнообразна експериментална работа е главно нейно лично дело. Идеите, целите, задачите и обсъждането на получените резултати са, както обикновено, общо дело с ръководителите на дисертационния труд с допустим приоритет на последните..

5. Забележки и препоръки

5.1. Препоръчително е използването на методи за определяне на плътността на мрежите (дължина на междувъзлови сегменти, преди всичко между възлите в основните полимерни вериги). Използването на концентрацията на омрежващия агент като мярка за тази плътност е първо (много грубо) приближение. Доказателство за това е невъзможността да се получи еластичен ПКБ гел от мрежа, синтезирана при концентрации на омрежващия агент над 20 пъти по-високи от тези при които се получава ПСБ мрежа, продуцираща еластичен хидрогел. Факт, оставен без даже предположение за обяснение.

5.2. Литературната справка, както се и очаква, е пъстра и далеч от пълнота. Последната едва - ли е възможна при споменатата тематична многоплановост. Ударението в справката е върху приложението на полицивитерийонни (ПЦЙ) материали за превръзки на рани и тяхната рефлексия на различни външни въздействия (Т, рН, йонна сила). Некоректно тези рефлексии са наречени интелигентни свойства на ПЦЙ. Интелигентност е много повече от рефлексия. Вярно, на някои места определението „интелигентно” е поставено в кавички.

- Лошо структуриран е включеният в справката материал: започва се с дефиниция за полицивитерийон (ПЦЙ), след това се обсъждат тези за полиелектролити (ПЕ) и полиамфолити (ПА), а после отново следва раздел за ПЦЙ. Нарушената естествена градация „ПЕ-

поликатион/полианион-ПА-ПЦЙ” гарнирана с объркващата дефиниция за полиелектролит (стр.6), демонстрираното на стр. 7 неразбиране на разликата между ПЦ и ПА (особено за ПА в изоелектрично състояние) формират впечатление за липса на задълбочено познаване на този клас полимери. Не е предмет на обсъждане основната отлика на ПЦЙ – наличието в макромолекулите им на стабилни диполи (както в страничните, така и в основната вериги), чийто диполен момент е векторна величина със скаларна големина и ориентация в средата.

- Фиг. 2 е излишна. Тя не демонстрира цвитерйонна структура.
- Представеният RGD мотив (схема 4) е с раздалечени с13 ковалентни връзки заряди, докато при алтернативно свързване на трите аминокиселини се получават два крайни дипола, с отстоящи заряди на 4 и 7 ковалентни връзки. Вероятността във втория случай за формиране на ориентиран дипол е многократно по-голяма.

- Броят на видовете ПЦЙ е много по-голям от посочените на схема 7.
- Дефинициите за ГКТР и ДКТР (стр. 18) са неверни.
- Липсва първична информация за биохимията и микробиологията на използваните в изследването ензими (колагеназа, миелопероксидаза, Subtilizin DY), клетки, бактерии.
- Липсва и информация за механизма на хронифициране на раните. В раздел II.7 (стр. 33, схема 16) са представени и обсъдени фазите на зарастване на ХР. По-важно и интересно е познаването на причините за хронифициране на раните, както и за прехода «остра рана – ХР» с цел профилактика и тяхното предотвратяване.

- „Гръмотевичен” израз на стр. 23 и 24 („степен на полимеризация на сулфобетаинов мономер”). Подобно е въздействието на твърдението на стр. 7: „В ПЦЙ **всяко** мономерно звено е формално неутрално, а в ПА **всяко** мономерно звено има свой заряд”. Тези „гръмотевичи” накърняват съществено правомерността на изискуемата научна степен „доктор по полимери”. Ползвайки речника на този труд, да се надяваме нараняването да не хронифицира.

- Не са посочени и обсъдени 9-те изисквания за идеална превръзка. На стр. 35 са посочени само 5 от тях.

- Пропуск е липсата на обсъждане на литературната информация за намерилите приложение алгинатни материали за превръзки на рани. Тя е колкото необходима, толкова и поучителна. Не само за сравнение с разработваните в този труд ПЦЙ материали. Това с особена сила важи за материалите на основата на полиелектролит-полиелектролитните природни алгинат-хитозанови комплекси: биосъвместими, нетоксични, със собствена бактерицидност, меки, здрави и незалепащи към раната хибридни ковалентни и физични полимерни мрежи с контролируема плътност. Може би двата вида полимерни мрежи биха могли да се допълнят синергично!

Няма съмнение, че без посочените пропуски, дефинираните цел и задачи биха били по-други.

5.3. По експерименталната част:

- Липсва анализ на получения КБМА, доказващ неговата чистота.
- Не споделям твърдението (стр. 38), че синтезът на ПКБ мрежи се извършва по аналогичен на този за ПСБ мрежи начин. Много различни са условията за двата синтеза. Във втория случай се използва трикомпонентен разтворител, инициаторът е редоксисистема с 14 пъти по-висока концентрация на амониевия персулфат.

- Описанията на почти всички използвани аналитични методики (IV.2.2. - IV.2.4., IV.2.10. - IV.2.13., IV.2.15., IV.2.16.1. IV.2.16.2., IV.2.17.1., IV.2.17.2., IV.2.18., IV.2.20, IV.2.21, IV.4.6.) са без цитирани източници. Това е необходимо не само защото методиките не са на автора и общоприето правило, но и поради това, че част от описанията са неразбираеми (IV.2.4., IV.2.17.1., IV.2.18., IV.2.21.).

- При част от методиките (IV.2.11., IV.2.15., IV.2.16.1.), са използвани калибровъчни прави. Те са построени от автора, но само за последната от посочените методики е представена тази права графично и аналитично. Другите две прави са представени аналитично (y-x) без да се идентифицират координатите. Как би могло да се ползват тези прави от други колеги, макар и

само за сравнение на собствени резултати с тези на автора? Например как от определената по абсцисата на представената на Фиг. 1 калибровъчна права концентрация на серумния албумин (ензимния субстрат) се определя **директно** (като се ползва само информация, включена в описанието на методиката) концентрацията на ензима (Subtilisin DY)?

- В равенствата 1 и 5 една и съща величина (СН) е изразена по два несъвместими начина (две различни десни части на равенствата). Кое равенство е истина? Въпросът е значим, защото със СН (равенство 1) е означена определяната многократно степен на набъбване на мрежите, а по равенство 7 тя е използвана за определяне на процентното съдържание на свързаната вода в набъбналите хидрогелове.

Тук обаче ни посрещат отново „гръмотевични” изрази: „енталпия на чиста вода” (вероятно се има в предвид енталпията на стапяне на чиста вода), „енталпии на стапяне на всички ендотермични пикове в термограмата” (вероятно се има в предвид енталпията на стапяне на водата в хидрогеловите, характеризираща се с поне два ендотермични процеса; стапяне на свързана и на несвързана вода). (Раната клони към хронифициране!!!).

Но да оставим за момент без внимание тези речникови „гръмотевичи”. Тук безпокойство поражда твърдението, че числителят на равенство 6 се формира от енталпийте и на двата прехода в хидрогеловите. Защо? Нали по това равенство се определя процентното съдържание на несвързаната вода. Пък и в знаменателя е енталпията на стапяне на чиста вода, където съществува само несвързана вода. Следователно в числителя би следвало да бъде енталпията само на стапянето на несвързаната вода в хидрогела. Това е съдържателен въпрос. Без литературен източник, с тези „гръмотевичи”, неяснота в разчетните формули, липсата на термограмите за ПКБ и на взаимнопроникващите ПКБ/ПСБ хидрогелове, възниква много сериозно безпокойство за достоверността на представените на фигури 12-14 и 36 зависимости за относителните части на свързаната и несвързаната вода в изследваните хидрогелове. Настойчивата ми молба е да се представи и обсъди тази опитна информация.

- Описаните методики за определяне рН-чувствителността на ПКБ (IV.2.9.) и на ВПМ ПКБ/ПСБ (IV.4.3.) хидрогелове също изискват обсъждане. Неочакваното тук е, че една проба се използва за определяне на СН при всички изследвани рН стойности. Изважда се пробата след 24-часово набъбване при определено рН, обработва се с филтърна хартия и се потапя в разтвор с друго рН. Получената стойност на СН се отнася към тази на сухия хидрогел, потопен при първата рН стойност. Този икономичен за време и труд стъпков подход поражда въпрос за еквивалентност на промените в сложната мрежова структура при двата възможни прехода от началната суха мрежа: директно към набъбване в разтвор с дадено рН или през акумулирани мрежови трансформации в разтвори с различни рН стойности докато се достигне до същото рН. Проблемът е в ефекта на предисторията на полимерната мрежа. Той би следвало да се изпита преди да се пренебрегва. Моето очакване е, че предисторията съществено ще повлияе не само върху обсъжданите рН зависимости. Към това следва да се добави и обстоятелството, че с промяната на рН се променя и йонната сила на разтвора. Ето защо получените рН зависимости (фигури 11 и 35) са дискуссионни.

- В методиките за определяне на инхибиращата способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове (IV.2.12., IV.2.13., IV.2.14.) спрямо колагеназа и миелопероксидаза е използвана промяната в ензимната активност на негов разтвор след престояване в него на ПЦЙ мрежа. Промяната е отнесена към активността на ензимния разтвор без ПЦЙ мрежа. По този начин е определена промяната в ензимната активност на ензимния разтвор, а не на специфичната активност на двата ензима. Промяната, най-вероятно, е резултат на абсорбция на ензима при набъбването на ПЦЙ мрежа. Да се отнасят тези промени към инхибираща способност на хидрогеловите (фигури 16-19) е лишено от смисъл съждение.

5.4. По резултатите и обсъждането им

- От сравнението на представените на Фиг. 2 и на Фиг. 6 зависимости се откроява несъответствие между стойностите за СН на ПСБ мрежи. При стайна температура тези

стойности са 1.25 – 1.35 на Фиг. 6, докато на Фиг. 2 за 8 часа тези стойности варират от 3 до 5 за различните концентрации на омрежващия агент (ОА). Още по-драстични са разликите между показаните на Фиг. 2 и на Фиг. 28 стойности за РСН на ПСБ и ПКБ мрежи. За ПСБ мрежа на Фиг. 2 те варират от 3 до 7, докато на Фиг. 28 те се променят от 0.5 (???) до 2 в зависимост от концентрацията на ОА. При това ходът на изменение на тези стойности е противоположен; на Фиг. 2 тези стойности намаляват с увеличение концентрацията на ОА, докато на Фиг. 28 те нарастват при увеличение на същата концентрация. За ПКБ мрежа обсъжданите стойности варират от 4 до 6, докато на Фиг. 28 те варират от 9 до 5 с изменение концентрацията на ОА. За тази мрежа обаче и на двете фигури стойностите на РСН намаляват с увеличение концентрацията на ОА. Кой от тези зависимости са истински? Буди недоумение, че тези драстични разлики са оставени без внимание при обсъждането на резултатите.

- Подобна е ситуацията и със стойностите на модула на еластичност, представени на Фиг. 3 и 4 от една страна и на Фиг. 29 от друга. В този случай стойностите са получени по два различни метода (ДМТА и метод на Херц). И тук стойностите драстично се различават, а ходът на изменение на модула с изменението концентрацията на ОА за ПСБ мрежи е противоположен. Дефинираният по-горе въпрос е в сила и тук.

- Може би най-същественият недостатък на този раздел е липсата на първична информация, позволяваща възпроизводство на експерименти и формулиране на собствени съждения, отлични от тези на автора.

- Липсва раздел V.2.3.

5.5. По оформянето на дисертационния труд

- Най-същественият пропуск е липсата на автономност в текстовете под фигури и схеми. За да се разбере при какви условия са получени дадени зависимости се налага да се търси информация на десетки страници, отстоящи от фигурата. Понякога впечатлението е, че това е направено съзнателно за да се откаже търсещия от намерението си да се добере до истината.

- На Фиг. 3 текстът под фигурата е на следващите страници след фигурата, на други пък страниците завършват със заглавия на раздели (стр. 39, 43, 52).

- Много правописен брак.

6. Заключение

: Представеният труд е плод на трудна и многопосочна работа. Получени са насърчителни резултати, насочени към внедряването на ПЦЙ хидрогелове като активни материали за лечение на рани, включително и на ХР. Резултатите са отразени в публикации в международни списания по полимери, в съобщения и доклади на конференции и семинари. Колежката К. Русева е добила знания и опитност в интересна и обещаваща интердисциплинарна област. От другата страна са отбелязаните доста много пропуски, критики и въпроси, които предстои да се дискутират. Засега позицията ми е да подкрепя колежката Констанс Емилова Русева за присъждането и на образователната и научна степен „доктор” по специалност „Полимери”, направление 4.2. – Химически науки. Оставям си правото за изменение на мнението си след обсъждането на споменатите по-горе въпроси, противоречия и критики.

12.02. 2020 г.

Написал:

/проф. дхн Г. С. Георгиев/

