

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд

„Интелигентни полицивитерйонни материали с потенциално приложение като превръзки за хронични рани“

представен от ас. маг. **Констанс Емилова Русева,**

задочен докторант към катедра Фармацевтична и приложна органична химия, Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

по професионално направление 4.2. Химически науки (Полимери)

от доц. д-р **Лъчезар Костадинов Христов,**

Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Актуалност на темата

Дисертационният труд представлява научно изследване върху синтеза и някои свойства на омрежени полисулфобетаинови и поликарбоксібетаинови полимери. Изследванията са направени с оглед на бъдещо евентуално приложение на тези материали в превръзки за хронични рани. Актуалността на работата е безспорна, доколкото, от една страна, усилията по прилагане на споменатите материали за тази цел е все още в начален етап в световен мащаб; от друга страна, някои добре известни свойства на полицивитерйонните материали дават надежда за успешен развой на тези усилия; а от трета страна, клиничните проблеми при лечението на хроничните рани са сериозни и обществено значими.

Оформление, стил и изложение на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 105 страници, структуриран е традиционно и съдържа следните раздели: увод, литературен обзор, цели и задачи, експериментална част, резултати и дискусия, изводи, списък с научните публикации, списък с изяви на научни форуми по темата на дисертацията в периода на докторантурата и списък със специализации в чужбина и участия в научни проекти през същия период.

Изложението в дисертационния труд е в преобладаващата си част ясно и аналитично, стилът е стегнат, а техническото изпълнение е добро. Някои обяснения се повтарят многократно (напр. обяснението на механизма на антиполиелектролитния ефект), което ненужно разширява изложението; трудът би спечелил от повече вътрешни препратки с цел избягване на повторенията. Дисертацията е онагледена с 38 фигури, 24 схеми, 16 уравнения и 5 таблици, които улесняват нейното разбиране. Цитирани са 99 литературни източника, като те са посочени под линия на съответните страници. Авторефератът е оформен сбито, като в него не са включени литературен обзор и експериментална част, а е наблегнато на резултатите и тяхното обсъждане. За съжаление авторефератът и дисертацията не са в пълно съгласие помежду си – има разминаване в номерата на много от фигурите и дори темата на работата малко се различава. Налице е също разлика между хартиения и електронния вариант на дисертацията (различава се например разделянето на текста на страници). По-долу в рецензията ми навсякъде е цитиран хартиеният вариант.

Лошо впечатление прави необичайно голямата концентрация на печатни грешки, което лесно и сравнително бързо би могло да се поправи с поддържаните от всеки съвременен текстов редактор средства за проверка.

Анализ на литературния обзор, целите и задачите

Литературният обзор представя накратко полиелектролитите, полиамфолитите и полицивтерйоните с някои техни свойства, имащи отношение към темата на дисертацията – биосъвместимост, разтворимост, набъбване и чувствителност на последните към структурата на полимера, температурата, рН и йонната сила на средата. Обобщени са накратко особеностите на хроничните рани и предизвикателствата при тяхното лечение, като е направена връзка с полицивтерйоните като възможни материали за изработване на превръзки за такива рани. Представената информация е анализирана и са направени заключения за желаните свойства на една превръзка за хронични рани. Тези заключения са използвани за поставяне на цел на изследването и на задачи, с решаването на които тя да бъде постигната. Целта и задачите са определени кратко и ясно. Обзорът показва добро познаване, осмисляне и разбиране на световния опит по темата, вникване в подробностите и критичен анализ на данните.

Към изложението в този раздел имам някои забележки, като:

- Неясни означения: „ $pH=1$ “ (стр. 29, втори абзац. Вероятно се има предвид $pH \leq 1$?).

- Неясна или неправилна терминология: „голяма константа на дисоциация“ (стр. 26, началото на предпоследния абзац. $pK_a \approx 13$ трудно може да се нарече така.); „слаб катион“ и „слаб анион“ (стр. 26. Вероятно става дума за катиони със слабо изразен киселинен характер, съответно аниони със слабо изразен основен характер?); „ pK_a на карбоксилатните аниони“ (стр. 26, края на предпоследния абзац. Карбоксилатните аниони не претежават протолизна константа, такава се приписва на съответната им спрегната киселина, а за тях самите може да се определи pK_b .); „хипохлорната киселина (НСЮ)“ (стр. 34, втора подточка отгоре).

- Неясен смисъл: „...толкова по-широк е интервалът от рН, в който полиамфолитът и ПЦ проявяват своите свойства.“ (стр. 26, средата на предпоследния абзац. Не става ясно, за кои свойства става въпрос и как тези полимери ги проявяват?); „съотношението на зарядите в макромолекулата... може да бъде варирано... чрез реакция на полимеризация“ (стр. 28, в средата); „... изследват процеса на разтваряне на... полимери в разтвор.“ (стр. 29, в средата. За какъв разтвор става дума? В цитираната статия е изследвана разтворимостта в различни органични разтворители и са определени критични концентрации на електролити във воден разтвор, необходими за разтваряне на изследваните полимери).

- Неверни твърдения: „... в силно кисела среда протича... (б) депротониране на аниона.“ (стр. 26, предпоследен абзац. Става дума за карбоксилатен анион, който въобще няма как да се депротонира.); „толкова по-силно изразен киселинен характер има аниона, респективно карбоксилатния анион.“ (стр. 26, края на предпоследния абзац. Карбоксилатните аниони нямат киселинен характер в разглежданите условия – воден разтвор на полицивтерйон. По-правилно би било да се каже „толкова по-слабо изразен основен характер има анионът“.); цитираната на стр. 29 работа [55] (Salamon et al., 1977) не твърди това, което ѝ се приписва в дисертацията (всъщност там се описва синтез на цвтерйонни мономерни соли, в които както катионът, така и анионът могат да полимеризират и от системата нарочно отсъстват каквито и да било нискомолекулни соли).

Имайки предвид горните, бих си позволил да препоръчам повече внимание към подробностите и по-внимателна проверка и редактиране на изложението.

Анализ на експерименталната част

Експерименталната част на дисертацията описва синтетичната и аналитичната част от работата на авторката. Синтетичната част включва получаване на мономера карбоксибетаин метакрилат, както и получаване на единични мрежи от поли(сулфобетаин метакрилат) и поли(карбоксибетаин метакрилат) чрез редокс-иницирирана радикалова полимеризация в присъствие на омрежващ съмономер поли(етиленгликол) диакрилат. Гъстотата на получените

мрежи е регулирана посредством променливия дял на омрежващия съмономер в изходната мономерна смес, като са получени по няколко омрежени до различна степен мрежи от всеки вид. За съжаление не е направен опит да се свърже този дял със степента на омрежаване на продуктите. Тези продукти са означени посредством молната част на омрежващия агент в изходната мономерна смес, но е неясно, каква е реалната гъстота на мрежите. Това би затруднило други изследователи да сравнят получените от тях при различни условия на синтез мрежи с описаните в дисертацията. По тази причина не съм напълно съгласен с използването на думата „състав“ в заглавията на таблици 1 (стр. 38) и 2 (стр. 39). Получена е също взаимнопроникваща полимерна мрежа от поли(карбоксибетаин метакрилат) и поли(сулфобетаин метакрилат).

Не са описани използваните материали и вещества, което виждам като малък пропуск.

Аналитичната част включва охарактеризирането на получените мрежи. Изследванията са впечатляващо подробни и разностранни, като целта е била да се определят широк набор от свойства, всичките свързани по един или друг начин с крайната цел – да се получи подходящ материал, приложим в превръзки за хронични рани. Определени са: кинетиката на набъбване и равновесната степен на набъбване, модулите на съхранение и на загубите, модулът на еластичност, микротвърдостта по Vickers, влиянието на йонната сила, температурата и рН върху равновесната степен на набъбване, промяната на размера на пробите при набъбване, дяловете на свързаната и несвързаната вода в набъбналите хидрогелове, абсорбцията на колагеназа от разтвор, инхибиращата активност спрямо ензимите колагеназа и миелопероксидаза, свързването на катионите Zn^{2+} и Ca^{2+} , ефективността на натоварване със Subtilisin DY алкална протеаза и ензимната ѝ активност след натоварването, цитотоксичността и биосъвместимостта на хидрогелите и способността им да инхибират бактериален растеж и да възпрепятстват образуването на бактериални биофилми. За целта са използвани разнообразни аналитични методи и множество различни апарати, които са описани в дисертацията, което показва, че докторантката е запозната с множество методи за изследване и е придобила компетентност и опитност в различни области на охарактеризирането на полимерни материали, включително такива, свързани с биохимията и медицината. Използваните аналитични методики са подходящи за провеждане на съответните изследвания.

Като се има предвид целта на работата, намирам за удачно да се изследва по-подробно поведението на хидрогелите в областта на йонната сила, характерна за живата тъкан. Това е направено в изследване на температурната чувствителност на равновесната степен на набъбване на мрежите от поли(сулфобетаин метакрилат) и резултатите са представени на фигури 7 и 8. В повечето други изследвания обаче са използвани солеви концентрации, многократно надвишаващи физиологичната.

Имам някои въпроси и забележки към изложението в този раздел:

- Какво означават x и y в уравненията на калибрационни прави на стр. 43, 46 и 61? Съдейки по коефициентите, във второто уравнение вероятно става дума за величините, показани на съответната Фигура 7 и в същите като на фигурата размерности. Ако е така, би било добре да се използват някакви по-специфични означения, които да присъстват и на фигурата.

- Концентрацията от 250 mg/ μ L желатин (стр. 44, първи абзац) е просто невъзможна, а величината 15 mmol (края на стр. 45) не представя концентрация, а количество.

- За определянето на концентрацията на колагеназа в разтвор е използвана калибрационна права, която обаче е построена за разтвор на говежди серумен албумин (стр. 43). Аналогично, за определянето на концентрацията на Subtilisin DY в разтвор е използвана калибрационна права, която обаче е построена за разтвор на човешки серумен албумин (стр. 46). Доколко този начин на калибриране е надежден и ако е, на какви спектрални сходства на съответните разтворени белтъци се основава?

- На стр. 47 пише, че с помощта на калибрационната права, представена на Фигура 1, е определена концентрация на Subtilisin DY от 0.813 mg/ml. По-нататък се описва, че след абсорбция в хидрогела (при което, както личи от изложението, се очаква намаляване на концентрацията) „разтворът беше разреждан, за да се вмести в обхвата на калибрационната права“. Това е в противоречие с Фигура 1, според която концентрационният обхват на калибрационната права е от 2.5 до 10 mg/ml и концентрации като 0.813 mg/ml и по-ниски попадат извън него, при това от долната страна.

- Определението за ефективност на ензимното зареждане (края на стр. 47) изглежда странно по няколко причини. Първо, така определената ефективност отчита разлика в концентрациите, а не относително количество погълнат ензим. Ако например след установяване на равновесие концентрацията на ензима спрямо водата във вътрешността на хидрогела е същата като тази в стоковия разтвор (т. е. няма избирателна сорбция), то ефективността на ензимното зареждане според уравнение (13) би била нула. Ако пък проникването на ензима в мрежата е термодинамично неизгодно и концентрацията му вътре в мрежата при равновесие е по-ниска, отколкото навън, ефективността на ензимното зареждане би била отрицателна. Второ, предложеното уравнение не отчита съотношението на масите на сухия полимер и стоковия разтвор, от което дясната му страна се очаква да зависи по очевидни причини, и поради това не дава някаква инвариантна характеристика на мрежата.

- Същата забележка се отнася и за уравнение (8) (стр. 43). Тук в пояснителния текст по мое мнение са объркани понятията „количество“, „концентрация“ и „относителна концентрация“.

- Намирам поясненията в последната колона на Таблица 4 (стр. 48) за обърквачи. Реакция тече всъщност само в епруветка No 1.

- Има противоречие между реда за епруветка No 2 в същата Таблица 4 и пояснителния текст по-долу: на първото място се посочва концентрация на H_3PO_4 3 wt.%, а на второто – 70 wt.%.

- Мисля, че заглавието на раздел IV.2.10. (стр. 42) и свързаните с него текстове е неточно. Определени са не количествата, а относителните дялове на свързаната и свободна вода в хидрогелите. Разбира се, количествата също могат да се определят при отчитане на степента на набъбване, но тази величина не е пресмятана. Не е ли именно количеството на свързаната от единица маса хидрогел вода (а не относителният ѝ дял спрямо всичката абсорбирана вода) по-важен фактор за биосъвместимостта на материала?

Анализ на резултатите

Получените резултати са описани изчерпателно, кратко и ясно. Поради големия им брой тяхното обсъждане е направено непосредствено след представянето им в съответния раздел, което улеснява възприемането на информацията. Резултатите са свързани с научните публикации по дисертацията и изявите на авторката на научни форуми. Тяхното тълкуване е реалистично и обосновано, като не е допуснато преувеличаване на значението им за целта на изследването. Намирам за много ценно обсъждането на влиянието на рН върху биологичните отнасяния на изследваните хидрогелове (стр. 67). Цялостното ми впечатление е за внимателно проведено изследване, резултатите от което са добре обмислени и логично изтъкувани. Наред с това имам някои забележки и въпроси:

- Верен ли е мащабът на ординатата на Фигура 6 (стр. 59)? Той не съответства на сходни измервания (виж например Фигура 7).

- Таблица 5 (стр. 75) неправилно е номерирана 6 в заглавието си. Позоваванията на нея в текста правилно са „Таблица 5“.

- На стр. 65 (предпоследен абзац) пише „третичните R_3N^+ групи в състава на ПКБ са нечувствителни към рН“. Всъщност тези групи са четвъртични, а предвид това, че става дума

за полимер тук и на много места в следващото изложение би било по-разбираемо те да се означават с $-R_2N^+$.

- Ако са правилни, забележките ми към определението за степен на натоварване от предишния раздел поставят под съмнение тълкуването на резултатите, представени на Фигура 15 (стр. 71) и Фигура 31 (стр. 87).

- Изводът в средата на стр. 73 (след Фигура 17) ми се струва донякъде противоречив. Твърди се, че частичното намаляване на концентрацията на колагеназа е благоприятно за раната, а запазването на ензимната ѝ активност също е благоприятно, въпреки че двете явления имат точно противоположни биохимични последици – съответно намален и усилен протеолитичен ефект.

- Имам съмнения, доколко свободните йони Zn^{2+} и Ca^{2+} могат да се използват като добър модел на включените в ензим йони (раздел V.1.13.). Огромната разлика в размера на частичките, както и комплексното свързване на Zn^{2+} с три аминокиселинни лиганда в колагеназите не внушава особен оптимизъм.

- Има ли някакво обяснение за разликите между равновесните степени на набъбване, наблюдавани при сравнение на фигури 2 и 28?

- Може ли да се предложи обяснение на извлеченото от опитните резултати твърдение, че физичната мрежа е определяща за набъбването на полисулфобетаините, докато химичната мрежа е определяща за набъбването на поликарбоксибетаините (стр. 84)?

- На стр. 87 (предпоследния абзац) се твърди, че Subtilisin DY е бил имобилизиран в полицивтерийонни хидрогелове, което е в противоречие с написаното на следващата страница, че ензимът напуска матрицата.

- Изглежда ми по-удачно обсъждането на ензимното почистване на рани (стр. 89) да се премести в литературния обзор.

- Масираното използване на чуждици в научната литература е неизбежно предвид терминологията, но нищо не оправдава получаването на „нов сет“ (средата на стр. 83).

Анализ на изводите

Намирам изброените в дисертацията изводи за точни, правилни и достатъчно добре доказани от направените изследвания. Изразът „... доведе до разработването на нови функционални превръзки за рани...“ изглежда пресилен, защото внушава достигане до внедрен в практиката продукт, за което в дисертацията няма данни.

Заклучение

Принос на дисертацията е изследването на потенциала на полицивтерийонните мрежи, изградени от поли(сулфобетаин метакрилат) и поли(карбоксибетаин метакрилат) за създаване на превръзки за хронични рани. Получените резултати при изследването на разнообразни свойства на синтезираните от докторантката мрежи подкрепят възможността за такова приложение. Ето защо намирам формулираната цел на дисертацията, както и поставените във връзка с това задачи, за изпълнени.

Резултатите са публикувани в две статии в специализирани научни списания с импакт фактор. Трета статия е подадена за публикуване. Прави впечатление голямата активност на докторантката в научни форуми (16 участия с доклади и постери за по-малко от 4 години). Добър показател за научната ѝ дейност е също активното ѝ участие в изпълнението на научни проекти (5 проекта), както и 3 специализации в чужбина, две от които полугодишни.

Обемът и обхватът на извършената работа е повече от достатъчен според описаните в ЗРАСРБ и Правилника на Софийския университет изисквания за присъждане на докторска степен, както и според традициите във Факултета по химия и фармация. Личните ми впечатления от Констанс Русева са за сериозен, трудолюбив, внимателен и отговорен учен.

Докторантурата несъмнено е изиграла голяма роля за научната квалификация и професионалното израстване на докторантката, а получените научни резултати са актуални и имат приложна значимост.

Работата страда от известни недостатъци, които се постарях да опиша по-горе. Те са в по-голямата си част от технически характер и като цяло не намаляват съществено значението и достоверността на получените резултати. Надявам се изтъкването им да помогне на докторантката да ги избягва в бъдеще, като обръща повече внимание на точността и оформлението.

Въз основа на направения анализ мога да заключа, че предоставеният ми за рецензиране дисертационен труд представлява компетентно, задълбочено и обхватно научно изследване. Поради това убедено давам **положителната** си оценка и препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди на Констанс Емилова Русева образователната и научна степен „Доктор“.

София, 12.02.2020 г.

Рецензент:

доц. д-р Лъчезар К. Христов