

## РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

**ДОЦ. Д-Р ИВА СТЕФАНОВА ХРИСТОВА, Д.М.Н.**

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по научната специалност „Микробиология” – шифър 01.06.12

Тема на дисертационния труд: ПРОУЧВАНИЯ НА АНТИМИКРОБНИТЕ СВОЙСТВА НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ ХИБРИДНИ МАТЕРИАЛИ С ВКЛЮЧЕНИ СРЕБЪРНИ НАНОЧАСТИЦИ”

**Автор на дисертационния труд: ДАНИЕЛА ВАСИЛЕВА ПЕНЧЕВА, докторант към Отдел микробиология, Национален Център по Заразни и Паразитни Болести**

Дисертационният труд на г-жа Даниела Пенчева представлява една многообемна работа, изпълнена много прецизно и описана точно и ясно, което разкрива високата ерудиция на кандидатката. Обектът на изследване и подходите са новаторски. Изпитани са бактерицидните, фунгицидните и спороцидните свойства на пет различни новосинтезирани хибридни материали с включени сребърни наночастици. В изпитванията са включени 105 микроба – бактерии, гъбички, плесен, спорообразуващи бактерии - реферетни щамове и клинични изолати. Разработени и адаптирани са по няколко метода за изпитване антимикробните свойства на всеки хибриден материал – дисково-дифузионен метод, дълбочинен агаров метод, метод с отпечатьци от хибридни филм, повърхностен агаров метод, метод с макроразреждания. Изпитван е дори синергизъм на хибридни материали с антибактериални и антимикотични средства. Разработени са редица ин vivo опитни постановки за изпитване на биологичните свойства на изпитваните хибридни материали. Взети заедно – обемът на работа и начинът на представяне – убедително изразяват стойността на дисертационния труд.

Антибактериалните свойства на среброто са известни от дълбока древност. Съхраняването на вода в сребърни съдове с цел предотвратяване на инфектирането ѝ се описва в писмени документи от преди Новата ера. Активният принцип всъщност са отделените сребърни йони. Използването на сребърни йони започва много по-късно; широко се прилага сребърният нитрат още от 18 век за лечение на венерически заболявания и за отстраняване на излишна грануляционна тъкан. Използването на

наночастици, т.е. на частици с големина 10-80 nm, значително увеличава повърхността им и съответно активните места. Наночастиците сребро се включват в полимерни структури и така успешно се използват в редица области на медицината, в хранително-вкусовата промишленост, селското стопанство, козметиката и др. Липсват обаче конкретни микробиологични стандарти за изпитване на продуктите, съдържащи сребърни наночастици. В различните публикации данните за активността на наносреброто варират силно. Именно с тези задачи се заема докторантката, подготвила целия този огромен труд като свободна докторантура. Темата на докторантурата е особено актуална днес, във времето на растяща микробна резистентност. Възможно ли е използването на наночастици сребро да има подобен ефект като известните антибактериални и антимикотични средства и съответно да се прилага като алтернатива? Как трябва да се тестват *in vitro* бактерицидните, фунгицидните и спороцидните свойства на сребърните наночастици, така че да стане ясно какъв ефект може да се очаква от прилагането им? Това са въпросите, отговор на които дава настоящият дисертационен труд.

Написан е на 184 стандартни страници, от които 2 стр. увод, 53 стр. литературен обзор, цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 26 стр., резултати и обсъждане 77 стр., резюме на резултатите – 5 стр., библиография 12 стр, от които 135 източника на английски език и 4 на български, декларация за оригиналност – 2 стр. и публикации (8 бр., от които 4 в международни списания) и участия в научни форуми (9 бр.) – 2 стр. Самото представяне на 4 отпечатани в престижни международни списания с импакт фактор статии говори за актуалността на разработваната тематика, както и за качеството на изпълнение и значимостта на резултатите.

Литературният обзор съдържа подробна информация за използването на среброто, сребърните съединения, сребърните йони, колоидното сребро, сребърния зеолит и сребърните наночастици. И тъй като целта на дисертационния труд е насочена към стандартизиране на микробиологични методи при изпитване на бактерицидни, спороцидни и фунгицидни свойства на синтезирани полимери, съдържащи сребърни наночастици, дисертантката засяга в литературния обзор структурата на бактериалната клетка с устройството на клетъчната стена при Грам-положителни и Грам-отрицателните бактерии, цитоплазмената мембрана, рибозомите и бактериалната хромозома, като отделя специално внимание на изясняване мишените на действие на различните групи антибиотици. Описва също структурата на бактериалните спори и спорулирането, структурата на дрожди и плесени и трите основни типа размножаване при гъбичките с медицинско значение – вегетативно безполово, въздушно безполово и полово спорулация.



Специално внимание отделя на механизма на действие на сребърните наночастици върху бактериални клетки, дрожди, плесени, животински и човешки клетки, на данните за развитие на резистентност и на методите, които са използвани и които могат да бъдат използвани за определяне на биологичните свойства на хибридни материали с включени сребърни наночастици. Така на практика докторантката изяснява всички понятия, структури и процеси, които засяга в изложението си. Литературният обзор много подходящо завършва със заключение и обобщение, от които логично следват целта и задачите на дисертационния труд.

В материали и методи е представено описание на 5-те хибридни материала с включени сребърни наночастици, първият от които в твърдо състояние във вид на филм, а следващите 4 – в течно състояние, различаващи се и по вида на използвания стабилизиращ агент – поливинил алкохол, поливинил пиролidon или сулфокаликс. Подробно са описани използваните 12 бр. контролни микробни щамове (ATCC) и 93 бр. клинични микробни изолати. Използвани са 34 вида антимикробни дискове с различни антибиотици. Проучвания са извършвани и върху 3 вида лабораторни животни – BALB/c мишки, калифорнийски зайци и домашни кучета. В методите подробно са описани синтезът и физикохимичните изпитвания на всеки един от петте хибридни материали със сребърни наночастици, както и микробиологичните методи, използвани за изпитване на техните биологични свойства. Заслужава да се отбележи, че богатството на разработените и адаптирани методи е голямо достойнство на дисертационния труд. Разделът «Материали и методи» също завършва със заключение и обобщение на използваните методи.

В следващия раздел – «Резултати и обсъждане» подробно са описани резултатите от всички микробиологични методи, използвани за определяне на бактерицидни, фунгицидни и спороцидни свойства на всеки един от петте хибридни материали с наночастици.

1. Хибриден материал, базиран на PVA/TEOS матрикс с включени сребърни наночастици.

Изпитан върху контролни и резистентни клинични микробни щамове показва бактерицидни, фунгицидни и спороцидни свойства. Изследвана е връзката между концентрацията на прекурсора и степента на активност на материала. Сравнени са резултатите при използване на напоени с материала дискове и на такива, директно изрязани от материала. Направени са изследвания за синергизъм по дисково-дифузионния метод (ДДМ). Разработени са редица методи за изпитването му – дисково-дифузионен,

дълбочинен агаров, метод за взимане на отпечатъци от хибридни филм, синтезиран върху повърхността на петри, експериментална постановка с метод на заливане, експериментална постановка с повърхностния агаров метод, изпитване за синергизъм между антимикробните вещества и хибридният материал.

## 2. Заредени със сребърни наночастици PVOH-b-PAN мицели

Адаптиран е метод с двукратни серийни разреждания на изходната проба. Установена е минималната бактерицидна концентрация на материала за *E.coli* и *P. aeruginosa*  $0.36 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ , по-висока за *S. aureus* -  $2.88 \pm 1.75 \mu\text{g/ml}$  и липса на спороцидна активност към спорите на *B. subtilis*.

## 3. Хибриден материал PVP/AgNps

Този материал е изпитан в два варианта – приготвен чрез химична и чрез термична редукция, като са установени различия в свойствата му при различните начини на синтез.

При химична редукция се доказва бактерицидно действие, но фунгицидно действие при определяне на МФК има само срещу *C. tropicalis* и *C. krusei*. При термична редукция, обаче, е налице както бактерицидно, така и ясно изразено фунгицидно действие срещу изследваните гъбички, което е указание за влиянието на начина за редукция върху активността на полимера.

## 4. Хибриден материал PVA/AgNPs

С ДДМ са установени зони на задръжка, сходни с измерените при PVA/TEOS/AgNps. По метода на разреждане в агар е определена МПК към 71 клинични бактериални щамове с предварително установена резистентност към антибиотици. С метода на макроразреждания е установена МБК на четири от полирезистентните клинични щамове – 2 щамове *P. aeruginosa*, един щам *E. coli* и един щам *A. baumannii*.

Намерена е изявена фунгицидна активност на този хибриден материал, като са определени МФК както за контролните, така и за резистентните клинични щамове *Candida*.

Изпитванията за синергизъм по шахматния метод са показали антагонизъм при комбиниране на изпитваните антибиотици цефепим и пиперацилин с хибридният материал.

Ин виво изпитванията – дермален тест, тест за биотоксичност, прилагане във ветеринарната практика, показват поносимостта на материала и разкриват перспективи за използването му като инактиватор и консервант при производството на бактериални ваксини.

5. Хибриден материал с включени AgNps в сулфометилиран каликс[4]резорцинарен



Приложени са ДДМ и метод на двукратни серийни макроразреждания първо с бактериални и гъбични микробни щамове, а впоследствие с резистентни микробни щамове. Намерена е много добра бактерицидна и фунгицидна активност на хибридният материал. Установено е значението на методиката на синтез (in situ или чрез смесване) и ролята на стабилизатора за активността на материала.

Като безспорни приноси на дисертационния труд считам:

1. Установяването на значението на метода на синтез и проучване влиянието на изходната концентрация на сребърния прекурсор върху антимикробните свойства на полимера.
2. Адаптирането и стандартизирането на широк набор микробиологични методи за изпитване на бактерицидно, фунгицидно и спороцидно действие на хибридни материали с включени сребърни наночастици.
3. Изследванията за синергизъм с антибиотици и антимикотици на проучваните материали.

Дисертационният труд е богато илюстриран с 58 фигури и 44 таблици, които са убедителен доказателствен материал за извършената огромна работа.

Направените от мен бележки, предимно от редакционен характер, при предварителното обсъждане на дисертационния труд бяха изцяло взети под внимание. Нямам други критични бележки.

В заключение, дисертационният труд на Даниела Василева Пенчева е един новаторски и многообхватен труд. В него тя се представя като прецизен изследовател, способен не само да прилага разнообразни микробиологични методи, но и да анализира резултатите от тях. Открояват се оригинални научни приноси. Считам, че рецензираният дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ за приложението му. Като давам положителната си оценка, предлагам на членовете на научното жури да присъдят на г-жа Даниела Василева Пенчева образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност 01.06.12 Микробиология.

София, 25 юни 2012 г.

Рецензент:

(доц. д-р И. Христова, дмн)