

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Биляна Панчева Николова-Лефтерова,

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторантска програма „Биофизика“, към секция „Липид-белтъчни взаимодействия“ – ИБФБМИ-БАН.

Автор: Даяна Славчова Бенкова

Тема: „Биологична активност на хитозан-базирани наноматериали“

Научни ръководители:

проф. д-р Галя Станева

доц. д-р Анелия Костадинова

Форма на обучение: свободна докторантура

1. Актуалност и значимост на разработвания научен проблем

Представеният дисертационен труд е посветен на една изключително актуална и перспективна област на съвременната биофизика и нанобиотехнологии – изследването на биологичната активност на хитозан-базирани наноматериали и техните взаимодействия с биологични мембрани и фитопатогенни микроорганизми.

През последните две десетилетия наноматериалите се утвърдиха като едно от най-бързо развиващите се направления в биомедицинските и биотехнологичните науки. Особен интерес представляват биосъвместимите полимерни наноматериали, способни да служат като носители на лекарствени вещества, антимикуробни агенти или функционални компоненти на интелигентни биоматериали. Сред тях хитозанът заема особено място поради своята биосъвместимост, биоразградимост, ниска токсичност и възможност за химична модификация.

Същевременно механизмите на взаимодействие между наноматериалите и клетъчните мембрани все още не са напълно изяснени. Разбирането на тези взаимодействия е от съществено значение както за медицинските приложения на наноматериалите, така и за оценката на тяхната безопасност и ефективност.

Друг важен аспект на дисертационния труд е търсенето на нови средства за контрол на фитопатогенни микроорганизми. В условията на нарастваща резистентност към конвенционалните фунгициди и необходимостта от устойчиво земеделие разработването на екологично безопасни антимикуробни системи представлява значима научна и обществена задача.

Следователно тематиката на дисертационния труд е безспорно актуална, научно значима и съответства напълно на съвременните тенденции в развитието на биофизиката, нанобиотехнологиите и приложната биология.

2. Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е разработен върху 148 страници и включва всички необходими структурни компоненти на едно съвременно научно изследване – увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, заключение, научни приноси, публикации по темата и използвана литература.

Структурата на дисертацията е логична, последователна и добре балансирана. Отделните раздели са свързани помежду си и водят последователно към решаването на поставените научни задачи.

Прави впечатление високото качество на оформлението на дисертацията. Текстът е написан на добър научен език, резултатите са представени ясно и са онагледени чрез голям брой фигури, таблици и схеми.

3. Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е задълбочен и показва отлична осведоменост на докторантката относно състоянието на изследванията в областта.

Разгледани са:

- структурата и функциите на биологичните мембрани;
- организацията на липидните домени;
- свойствата на хитозана;
- методите за получаване и характеризиране на наноматериали;
- биологичните ефекти на метал-оксидните наночастици;
- антифунгалната активност на нанокompозитни системи.

Особено положително впечатление прави критичният подход при анализа на литературните данни. Авторката не се ограничава до описателно представяне на информацията, а прави сравнения между различни научни концепции и очертава нерешените проблеми в областта.

Литературният обзор изпълнява успешно основната си функция – създава необходимата теоретична основа за формулирането на целите и задачите на дисертацията.

4. Оценка на целите и задачите

Основната цел на дисертационния труд е ясно формулирана и е насочена към изследване на взаимодействията между хитозан-базирани наноматериали и моделни мембранни системи, както и към оценка на тяхната антифунгална активност.

Поставените задачи са конкретни, логично обосновани и напълно съответстват на поставената цел.

След анализ на представените резултати може да се заключи, че всички поставени задачи са изпълнени успешно.

5. Оценка на използваните методи

Методичният подход представлява една от най-силните страни на дисертационния труд.

Използван е широк набор от съвременни методи, включително:

- динамично светлинно разсейване (DLS);
- електрофоретично светлинно разсейване (ELS);
- HRTEM анализ;
- лаурданова флуоресцентна спектроскопия;
- фазово-контрастна и флуоресцентна микроскопия;
- метод за формиране на големи униламеларни везикули;
- тестове за антифунгална активност;
- анализ на маркери за оксидативен стрес;
- съвременни статистически методи.

Подборът на методите е напълно адекватен на поставените задачи.

Особено високо оценявам комбинирането на биофизични, физикохимични и микробиологични подходи, което позволява комплексно изследване на процесите на различни организационни нива.

6. Анализ и оценка на получените резултати

Най-същественият принос на дисертацията е системното изследване на взаимодействията между различни хитозан-базирани наноматериали и моделни мембранни системи.

Изследвани са и са описани колоидните характеристики - размери, морфология и повърхностен заряд на синтезираните наноматериали, в зависимост от последващото им приложение. Установено е, че комбинирането на хитозан с различни метални оксиди води до съществени промени в колоидните характеристики на получените хибридни нанокompозити, данните са представени в Таблица 2. Изображения, показващи морфологията на наноматериалите, получени с помощта на HRTEM метода са показани

на фигура 38. Резултатите от охарактеризирането на наноматериалите за третиране на фито патогенни гъби (диспергирани в 0.2% DMSO) са представени в таблица 3 и фигура 39.

В таблица 2 са представени и резултати от охарактеризирането на PEG-ZnO HNCs, а след това няма представени резултати с тези нанокomпозити защо?

В следващата глава е разгледано взаимодействието на наноматериалите с моделни мембрани. Моделните мембрани са три типа в зависимост от състава им, като на всяка следваща стъпка системата се усложнява. Монокомпонентните моделни мембрани представляват модел на Ld фазата на клетъчните мембрани, бикомпонентните EggSM/Chol LUVs служат за формиране на липиден модел в Lo фаза с рафт-подобни доменни аналози в еукариотната клетъчна мембрана, EggPC/Chol LUVs са използвани като модел на Lo фаза, докато три компонентните EggPC/EggSM/Chol LUVs се разглеждат като най подходящ модел на еукариотната плазмематична мембрана от всички модели в това изследване, поради липидния си състав и фазовата си хетерогенност. Установено е, че при третирането на хомогенни везикули с хитозанови наноматериали, лаурдановият спектър се измества към по-ниската дължина на вълната, което показва по-висока липидна подреденост.

Доказани са ясно изразени концентрационно зависими ефекти върху липидната организация при хомогенни, мембранни модели фигура 41A, както и количествени промени в липидната организация, в зависимост от типа на прилаганите наноматериали.

При втория тип моделни мембрани EggSM/Chol се наблюдава повишение на GP стойността до 40µg/ml фигура 42 A,B,C,D. Интересно е да се отбележи, че нанокomпозит CS-SiO₂ силно се отличава от останалите, като предизвиква експоненциално намаляване на GP стойността след третиране с концентрации от 40µg/ml.

При модела на Lo липидна фаза промените, настъпили след третирането с нанокomпозитите са в една посока – концентрационно зависимо повишаване на подредеността фигура 43.

При везикули, формиращи от трикомпонентната смес EggPC/EggSM/Chol, също се наблюдава подреждащ ефект. Най-ясно изразен след третиране с чисти хитозанови наночастици, последван от PEG-ZnO фигура 44.

Особено интересни са резултатите, показващи, че различните наноматериали индуцират различна степен на подреждане на липидните мембрани в зависимост от тяхното фазово състояние.

Защо само липозомите формиращи от монокомпонентна смес са третирани с 1% оцетна киселина (разтворителя, в който са приготвени нанокomпозитните материали)?

Установени са промени във физикохимичните характеристики (среден размер, полидисперсност и ζ -потенциал) на хомогенните липозоми след третиране с чисти хитозанови наночастици и CS-CuO HNCs фигура 45.

Съществен научен интерес представляват и наблюдаваните морфологични трансформации на гигантските униламеларни везикули, включително процеси на

адхезия, сливане, инвагинация и мембранна дезинтеграция. Тези резултати предоставят ценна информация за възможните механизми на взаимодействие между наноматериалите и клетъчните мембрани.

Втората част от дисертацията е посветена на антифунгалната активност на хитозан-базираните нанокompозити спрямо два щама фитопатогенни гъби *A. solani* и *F. solani*.

И двата щама се повлияват от действието на HNCs. Най-голяма антифунгална активност показват CS-ZnO нанокompозитите фигура 54.

Изследвани са и маркерите за оксидативен стрес: MDA маркер за липидна пероксидация и SOD като ензим от антиоксидантната защита на клетката. Установено, че при третиранена шам *F. solani* с CS-CuO (0.5mg/ml) се отчитат най-високи нива на ензима супероксид дисмутаза фигура 55. За другите два нанокompозита е установена концентрационна зависимост. Докато за шам *A. solani* ефект се наблюдава само след третиране с CS-SiO.

Защо няма стойност за супероксид дисмутаза след третиране с 1mg/ml CS-CuO, нулева стойност ли е или е пропусната?

Повишават се нивата на PCC след третиране с всички изследвани CS-HNPs, като дозозависим ефект се отчита само при CS-CuO и CS-ZnO нанокompозити и при двата щама фигура 56. Аналогични резултати са получени и за нивата на MDA фигура 57.

В последната глава са разгледани промените в липидната подреденост, в резултат на третирането на двата изследвани фунгални щама с CS-HNPs. Избраните концентрации отново са 0.5 и 1.0 mg/ml. След третиране с CS-CuO се отчитат по-високи стойности на GP и при двата щама, което е маркер за увеличение на липидната подреденост, като отчетливо по-силен е ефектът при шам *F. solani* фигура 58A. Интересни резултати са получени след третиране с CS-ZnO, спрямо шам *A. solani* има ясно изразен концентрационно зависим флуидизиращ ефект, докато при *F. solani* ниската концентрация втвърдява мембраната, а по-високата леко я флуидизира фигура 58C.

Получените резултати показват обещаващ потенциал за приложението на CS-HNPs като алтернатива на традиционните фунгициди.

7. Научни и научно-приложни приноси

Приемам формулираните от авторката приноси и считам, че те могат да бъдат обобщени в следните основни направления:

Научни приноси:

- Получени са нови знания за взаимодействията между хитозан-базирани наноматериали и моделни мембрани.
- Установени са закономерности между структурата на наноматериалите и индуцираните промени в липидната организация.

- Изяснени са механизми на мембранно взаимодействие чрез комбиниране на спектроскопски и микроскопски методи.
- Получени са нови данни за ролята на фазовото състояние на мембраните при взаимодействието им с наночастици.

Научно-приложни приноси:

- Доказан е потенциалът на хитозан-базираните нанокompозити като антифунгални агенти.
- Създадена е основа за разработване на нови екологично безопасни средства за растителна защита.
- Получените резултати могат да бъдат използвани при разработването на функционални наноматериали за биомедицински приложения.

8. Публикации

Резултатите от дисертационния труд са публикувани и представяни на научни форуми. Това показва, че получените резултати са получили научно признание и са станали достояние на международната научна общност.

Считам, че публикационната активност е напълно достатъчна за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

9. Критични бележки, въпроси и препоръки

Към дисертационния труд нямам съществени критични бележки.

Имам следните въпроси:

- *В таблица 2 са представени и резултати от охарактеризирането на PEG-ZnO HNCs, а след това няма представени резултати с тези нанокompозити защо?*
- *Защо само липозомите формиранни от монокомпонентна смес са третирани с 1% оцетна киселина (разтворителя, в който са приготвени нанокompозитните материали)?*
- *Защо няма стойност за супероксид дисмутаза след третиране с 1mg/ml CS-CuO, нулева стойност ли е или е пропусната?*

Бих препоръчала в бъдещите изследвания да бъдат включени:

- експерименти върху клетъчни модели;
- оценка на цитотоксичността върху различни типове клетки;
- разширяване на изследванията върху други групи патогенни микроорганизми;
- проучване на възможностите за практическо приложение на разработените нанокompозити.

Тези препоръки не намаляват по никакъв начин високата научна стойност на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд на Даяна Славчова Бенкова представлява завършено, самостоятелно и оригинално научно изследване с ясно изразени научни и научно-приложни приноси.

Докторантката демонстрира задълбочени теоретични знания, отлично владееене на съвременни експериментални методи, способност за критичен анализ на резултатите и умения за провеждане на самостоятелна научноизследователска работа.

Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и нормативните документи на Института по биофизика и биомедицинско инженерство към Българската академия на науките, за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

Убедено давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на Научното жури да присъди на Даяна Славчова Бенкова образователната и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „Биофизика“.

Дата:19.06.2026.....

Рецензент: