

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФ. Д-Р МИЛКА МИЛЧЕВА МИЛЕВА

Ръководител на лаборатория „Модификатори на биологичния отговор и патогенеза на вирусните инфекции“ - Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

Относно: провеждане процедура за защита на дисертационен труд на Мариета Димитрова Белчева - докторант на самостоятелна подготовка в Департамент “Биотехнология”, Лаборатория “Биоремедиация и биогорива” - ИМикБ – БАН.

ДИСЕРТАЦИЯ НА ТЕМА: „Нови фотосенсibiliзатори и въглеродни копозити, като агенти с антимикробно действие“

Научни ръководители: проф. д-р Людмила Кабаиванова от ИМикБ-БАН;
проф. д-р Бойко Цинцарски от ИОХЦФ-БАН

ОБЛАСТ НА ВИСШЕТО ОБРАЗОВАНИЕ 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ 01.06.12 „Микробиология

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие със Заповед № I-108/31.07.2024 г. на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН (ИМикБ) по решение на Научния съвет на ИМикБ, Протокол № 4 от 23.04.2024 г., според които съм включена в научното жури.

Прегледът на документите показва, че процедурата по защитата е спазена. Представеният комплект материали е в съответствие с изискванията на Глава II, Раздел II "Условия и ред за придобиване на образователната и научна степен "Доктор" от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ при Българска академия на науките и включва всички необходими документи.

Познавам кандидатката по конкурса, нямам общи публикации с нея и не съм в конфликт на интереси, съгласно закона.

КРАТКИ БИОГРАФИЧНИ ДАННИ

Мариета Димитрова Белчева е родена на 19.09.1974, в гр. София. През 2001 г. завършва Медицински Университет - София, Медицински факултет и придобива магистърска степен по медицина. Същата година придобива още една магистърска степен - по химия и физика в Софийски университет "Св. Климент Охридски".

В периода 2001-2014 г. работи като гл. асистент, Началник „Микробиологична лаборатория“ в областта на оралната и клинична микробиология към МУ - София. През 2017 г. заема длъжност "Началник микробиологична лаборатория“ в ДКЦ "СОФИЯМЕД". През 2021 г. е назначена като специалист в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

През времето на трудовия си стаж, Мариета Белчева е специализирала в престижни болници и клиники:

2002-2005 специализация по микробиология в Катедра по медицинска микробиология, МУ-София;
2005г. 3 месеца специализация /IF, FISH/ в Цюрихския университет в Швейцария;
2010-2011 специализация по инфекциозни болести във ВМА-София:
2013г. 3 месеца специализация /RT-PCR/ в Университетски медицински център Грьонинген, Холандия;
2023-2024 - 5 месеца специализация в Университетски клиника Мюнстер, Германия
Владее отлично руски, немски и английски език.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД е посветен на антимикробното действие на новосинтезирани, съдържащи метали фталоцианинови фотосенсибилизатори и въглеродни композити, с оглед приложението им съответно като алтернатива в борбата с инфекции в лицево-челюстната област и като антибактериални агенти при пречистване на въздух.

Микробиотата в устната кухина е сбор от бактерии, вируси и гъбички, живеещи в устата и често я наричат „мини-имунна система“. Тя играе ролята на пазител на входната врата на организма, защото води директно до дихателната и храносмилателната системи, където има риск от попадане на вирусни и бактериални инфекции в организма. Бактериите живеят и се размножават не само върху зъбите и между тях. Огромно количество бактерии се натрупва върху езика, а също така на бузите. В много случаи те са причинителите на заболявания, които се разпростират в областта на устата, зъбите и челюстта от кариозни лезии, през заболявания на пародонта, до бактериални инфекции на меките тъкани.

На преден план и тук изпъква сериозен световен проблем при лечението на всички инфекциозни заболявания - антимикробната резистентност, който Световната здравна организация е обявила за една от 10-те най-големи глобални заплахи за човешкото здраве.

В този аспект темата на дисертационния труд е изключително актуална и безспорно касае всеки един от нас. Представените резултати имат сериозен оригинален принос в тази специфична ниша на науката и нагледно доказват връзката между проведените научни изследвания и тяхната значимост в медицинската практика.

Предложен е подход за разрешаване на актуални в медицината и клиничната практика проблеми, като едновременно с това се разширява и познанието върху терапевтичната ефикасност и антимикробното действие на новосинтезирани, съдържащи метали фталоцианинови фотосенсибилизатори и въглеродни композити. Използван е оригинален алтернативен начин на борба с инфекции в лицево-челюстната област, а също и на антибактериалното пречистване на въздух. Мариета Белчева се е възползвала от предимството на свободната форма на докторантура, за да проведе сериозен и задълбочен набор от изследвания в доста продължителен период от време - 2010 до 2024 год. Придобитите знания от двете магистратури ѝ дават стабилна основа за многофакторен логически анализ, дискусия и оформянето на комплексни изводи от получените резултати. Безспорен тук е и опитът на двамата научни ръководители за методичния подбор и многостранна интерпретация.

Използвани и оптимизирани са подходи за борба с бактериални инфекции в устната кухина и тяхната профилактиката за получаване на по-добра бактериална редукция. Едновременно с това, акцентът попада върху минимизиране негативните последствия на използваните днес методи. Проучен е ефектът на фотодинамичното инактивиране на нови метало-съдържащи фталоцианинови фотосенсибилизатори срещу едни от най-често срещаните микроорганизми *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*.

Извършена е оценка на антимикробното действие и на друг клас съединения - новосинтезирани метал-въглеродни композити, като критериите, по които са проследени и отчетени ефектите при двете експериментални схеми, са прецизно подбрани.

При изработването на дисертационния труд докторантката е използвала базата и опита на водещи български и европейски университети и институти. Изследванията са проведени в микробиологичните лаборатории на Факултет по дентална медицина, Медицински университет - София, България; Катедра микробиология при Университетски медицински център - Грьонинген, Холандия; Диагностично-консултативен център Софиямед - България; Институт по клинична микробиология на Университетска клиника - Мюнстер, Германия и Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“ в Институт по микробиология "Стефан Ангелов" - Българска академия на науките. Съчетани със сериозната база знания и умения, придобити от ас. Мариета Белчева от двете магистратури, са изградили сериозна у нея експертиза и многопланов интердисциплинарен поглед върху разрешаване на научните проблеми, поставени в настоящия дисертационен труд. Комбинирайки опита на екипите на двамата научни ръководители, около научната проблематика на дисертационния труд се е създал мултидисциплинарен екип със сериозни експертни умения в иновативните подходи за изследване на фотосенсibiliзатори и въглеродни копозити като агенти с антимикробно действие. Силно се надявам тази колаборация да се задълбочи и продължи в бъдеще и да реализира подобни интересни и насочено фундаментални изследвания, имащи проекция в медицинската практика.

ДИСЕРТАЦИЯТА е написана на 148 стандартни страници, съдържа 56 фигури и 4 таблици. Трудът е структуриран съобразно изискванията и включва: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи, Приноси, Списък на публикации и участия, свързани с темата на дисертационния труд, Литература (304 автори).

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е задълбочен и целенасочен, отлично структуриран.

Акцентът пада върху данни от научната литература относно:

- Микробиологичната характеристика на бактериите и тяхната клинична изява в макроорганизма и в частност лицево-челюстната област, което обосновава за тяхната селекция в проведените изследвания;
- Основни механизми на резистентността, като предпоставка за проучване на нови решения за терапия;
- Коментирана е същността на фотодинамичната терапия;
- Разгледани са постиженията на фотодинамичната терапия в сферата на микробиологията, като база за сравнение с резултатите от проведените проучвания;
- Основни данни за същността, класификация, получаване и употреба на активния въглен, като съставка на въглеродните композити;
- Изложени са проучванията с въглеродни композити в сферата на микробиологията, като база за сравнение с получените резултати.

МАТЕРИАЛИ

В тази глава са описани биологичните материали, референтните щамове *Staphylococcus aureus* 1337, (MRSA); *Enterococcus faecalis* 391574; *Candida albicans* 74; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; *Porphyromonas gingivalis* ATCC 3247; *Prevotella intermedia*

ATCC 49046; *Escherichia coli* ATCC 25922, както и клиничните изолати на *Streptococcus sanguis* СФ3/9, *Enterococcus faecalis* СФ1/9, *Streptococcus salivarius* СФ2/9, изолирани от пациенти с хроничен периодонтит на Катедрата по консервативно зъболечение към Факултета по дентална медицина, Медицински университет-София (София, България) и произволно избрани клинични щамове *A. actinomycetemcomitans* (X295/13), *P. gingivalis* (X324/13) и *P. intermedia* (X490/13), получени от пациенти на Лаборатория за орална микробиология към Университетския медицински център Гронинген (Грьонинген, Холандия), *S. aureus* (СМ-Б3822/21), изолиран от гърлен секрет на пациент на микробиологичната лаборатория на Диагностично-консултативен център Софиямед.

Показан е:

- Дизайнът на новият биоматериал на основата на фталоцианинови комплекси на цинка, еднозначно показал фотодинамична активност;
- Синтезата на метал-въглеродни композити;
- Използвани реактиви и хранителни среди.

Методи

Надлежно е описано получаването на суспензии от референтни микроорганизми, определяне на фототоксичността на микроорганизмите, методите на пробовземане на материали от пациентите, изолиране и идентификация на патогенните бактерии, определяне на фототоксичност при биофилми от микроорганизми при обработката на екстрахиранни зъби и др.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите и обсъждането от опитите с новите метало-фталоцианинови фотосенсибилизатори са разгледани по точки в зависимост от биологичния модел, върху който се прилагат, а именно референтни щамове, клинични изолати и биофилми. Всички резултати са отлично онагледени в таблици и фигури, с много точно описание и дискусия.

В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА АС. МАРИЕТА БЕЛЧЕВА СА ОТБЕЛЯЗАНИ СЛЕДНИТЕ ИЗВОДИ:

1. При проведените експерименти с аеробни референтни бактериални култури, най-добър антимикробен ефект от изпитаните фотосенсибилизатори се наблюдава при използване на галиев фталоцианин.
2. Върху изпитваните анаеробни референтни бактериални култури, най-силен ефект от действието на фотосенсибилизаторите се установява при използване на метилпиридилокси цинковия фталоцианин и р-тетра-меркаптопиридин цинковия фталоцианин.
3. Цинковият фталоцианин се оказва най-ефективен при третиране на референтни дрождеви култури.
4. Изпитаните клинични аеробни бактериални изолати бяха повлияни в най-висока степен при приложение на цинков фталоцианин, но въздействието, сравнено с референтните щамове е по-слабо.
5. Въздействието върху клиничните анаеробни бактериални изолати е най-явно при приложение на тетра-метилпиридилокси цинков фталоцианин, р-тетра-меркаптопиридин цинков фталоцианин и окта-меркаптопиридин цинковия фталоцианин, като ефектът, сравнен с този при референтните щамове е по-силен.
6. В опитите с биофилми, най-добър ефект се наблюдава при използване на силициев фталоцианин върху 48-часов биофилм на *E. faecalis*.

7. Новосинтезираните композитни материали имат много добър потенциал за приложение като антибактериални средства, особено медният композит.
8. Методът на получаване на активния въглен не влияе съществено на антибактериалните свойства. При прилагането на различните методи установихме близки стойности за въздействието им, като то е най-забележимо при едноетапния хидропиролиз.
9. Най-добър резултат при *E. coli* или 100% намаление на микробното число в първите минути се наблюдава, когато се използват композити при концентрация на мед от 7.5% и по-висока.
10. Получените резултати показват, че новосинтезираните композитни материали имат много добър потенциал за приложение като антибактериални средства срещу стафилококи (*S. aureus*), особено медният композит.
11. Физико-химичното характеризиране на композитите потвърждава съдържанието на метали и показва въглеродна матрица с много добри абсорбционни свойства и малко съдържание на примеси.
12. Композитите на активен въглен с метални наночастици обединяват свойствата на металите и на активния въглен, което допринася за повишаване качеството на крайния продукт и приложението на неговите антибактериални свойства, например в хигиенни устройства и индивидуални маски.

ОФОРМЕНИ СА И 6 ПРИНОСА, С ЧИЯТО ФОРМУЛИРОВКА СЪМ НАПЪЛНО СЪГЛАСНА.

1. Приложението на фотодинамично инактивиране с метало-съдържащи фталоцианинови фотосенсибилизатори е нова оптимизирана алтернатива на използваните днес методи в борбата с бактериалните инфекции в устната кухина и тяхната профилактика.
2. Въглеродните композити се синтезират по нова екологична технология от отпадъчни продукти като прекурсори.
3. Обединяването в метало-съдържащите въглеродни композити на свойствата на металите и на активния въглен допринасят за повишаване качествата на желания продукт и разширяване приложенията на антибактериалните му свойства.
4. Получените резултати при опитите *in vitro*, могат да послужат за изготвянето на протокол за по-нататъшни опити *in vivo*.
5. Използването на фотосенсибилизатори и новосинтезирани активирани въглеродни композити е нов подход за намаляването на прекомерната употреба на антибиотици в унисон със съвременната тенденция за преодоляване на антибиотичната резистентност.
6. Разработването на нови антибактериални материали е важна стъпка в борбата срещу патогенните организми при хората и в околната среда.

Приложеният към документите по процедурата автореферат напълно отразява съдържанието на дисертацията.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ – забелязват се някои дребни технически неточности, които не намирам за съществени.

ОЦЕНКА НА ПРЕДСТАВЕНИТЕ МАТЕРИАЛИ ВЪВ ВРЪЗКА С КРИТЕРИИТЕ В СЪОТВЕТСТВИЕ СЪС ЗРАСРБ

Публикационната активност на ас. Мариета Белчева напълно отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен "Доктор". Резултатите от изследванията са отразени в 3 научни статии, от които 2 в списания с общ импакт фактор и 4.74. Приложен е и един цитат, но аз открих още два, вероятно излезли след подаване на документите за стартиране на

процедурата. Този факт подсказва повишения интерес към изследваните в дисертацията проблеми.

По настоящата процедура за защита на дисертационния труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, ас. Мариета Димитрова Белчева е покрила всички критерии в съответствие със ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане в Институт по микробиология - БАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява комплексно и оригинално изследване върху антибактериалните протективни ефекти на новосинтезирани фотосенсибилизатори и въглеродни копозити. Отличното познаване на литературата, прилагането на широк набор от модерни методи, добре формулираните и изпълнени задачи, задълбоченият анализ и отличното онагледяване на получените резултати, както и достатъчната научна продуктивност на докторантката ми дават основание убедено да подкрепя, както и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на Магистър по медицина, Магистър по химия и физика, ас. Мариета Димитрова Белчева, образователната и научна степен “Доктор”.

22.09.2024 г.

София

/Проф. д-р Милка Милева/