РЕЗЮМЕТА НА ОСНОВНИТЕ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ПРИНОСИ

на доц. д-р инж. Райна Георгиева Бряскова,

представени за участие в конкурс за професор по 4.2 Химически науки

(Химия на високомолекулярните съединения)

към ХТМУ, ДВ, Брой 23/19.03.2024г.

Публикационната активност, с която доц. д-р Райна Бряскова участва в конкурса за АД „професор“ включва 19 статии, от които **12** в международни списания с импакт фактор (сумарен импакт фактор Σ=**38,376**) и **7** в индексирани списания без импакт фактор, с SJR. От тях, **5** публикации са в списания с **Q1**, **7** публикации са в списания с **Q2**, **5** публикации са в списания с **Q3** и **2** публикации са в списания с **Q4**. Научната продукция, с която доц. Райна Бряскова участва в конкурса е цитирана **107** пъти. Има 20 участия на международни, национални и университетски научни форуми. Била е ръководител на **7** договора към НИС-ХТМУ и ръководител, координатор и участник в **6** договора към ФНИ, Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“, Оперативна Програма „Иновации и конкурентоспособност“ и Национална програма „Европейски научни мрежи“. Под нейно ръководство за периода 2016-2024г. успешно са защитили 18 студента, от които 10 за ОКС „Бакалавър” и 8 за ОКС „Магистър”. Изследванията на доц. д-р Райна Бряскова са насочени към получаване и приложение на хибридни материали чрез зол-гел метода, синтез и приложения на метални наночастици включени в полимерни материали, синтез, охарактеризиране и приложение на флуоресцентни полимерни материали за визуализация и лечение на ракови заболявания, както и получаване на иновативни антибактериални покрития на основата на нови фотоактивни наногелове.

Съавтор е на общо **53** статии, като **49** от тях са публикувани в списания с импакт фактор и импакт ранг, съгласно Scopus. Върху тях са забелязани **931** цитати, без автоцитати на всички съавтори, (**h** index = **15**, според Scopus, без автоцитирания).

Таблица 1. Минимални изисквани точки по групи показатели за академичната длъжност „професор“ по ПН 4.2. Химически науки към ХТМУ

Съдържание	Минимални изисквания за професор(брой точки)	доц. Р. Бряскова
Показател 1	50	50
Показател 2	-	
Показатели 3 или 4	100	115
Сума от точките на показателите от 5 до 10	200	215
Сума от точките на показател 11	100	214
Сума от точките на показателите от 12 до края	150	184
Общ брой точки	**600**	**778**

Научните и приложни приноси на представените трудове на доц. Бряскова могат да се обединят в няколко основни групи изследвания:

1. Синтез, охарактеризиране и приложение на полимерни материали с изявени антибактериални свойства за приложение в медицината.

1.1. Синтез, охарактеризиране и приложение на нови антибактериални хибридни материали с включени сребърни наночастици (публикации 1-2,7).

Сред металните наночастици, голям интерес предизвикват сребърните наночастици, поради уникалните свойства, които притежават и възможни приложения в различни области и по-специално в медицината като ефективни антибактериални средства. Използването на наночастици е нов метод, който води до ефективно подтискане на бактериалния растеж, особено когато са използвани сребърни наночастици (AgNps), за които е известно, че притежават мощна активност срещу бактерии, вируси и гъби. В сравнение със сребърните йони, сребърните наночастици се разглеждат като безопасни за околната среда. Силната антибактериална активност на сребърните наночастици е резултат на добре развитата повърхност, която осигурява максимален контакт със средата. Въпреки това, за да реализират потенциала си за технологични и биологични приложения, те трябва да бъдат включени в полимерна матрица, която може да образува тънки филми.

Ето защо, за пръв път са синтезирани нови хибридни материали на основата на поливинилов алкохол (ПВА) и три вида органосилани като аминопропил триетоксисилан (АПТЕОС), меркаптопропил триетоксисилан (МПТЕОС) и тетраетоксисилан (ТЕОС) с включени сребърни наночастици, чрез зол-гел метода, който е широко разпространен метод за синтез на хибридни материали. Използването на поливинил алкохол като филмообразуващ полимер за включване на сребърните наночастици е подходящо, тъй като ПВА е хидрофилен, биосъвместим и водоразтворим полимер. Тези характеристиките осигуряват на ПВА широко приложение в медицината. Сребърни наночастици, с различна концентрация са получени чрез термична редукция в присъствието на ПВА. За подобряване на неговите физикохимични и механични свойства се налага включването на аминопропил триетоксисилан (АПТЕОС), меркаптопропил триетоксисилан (МПТЕОС) и тетраетоксисилан (ТЕОС) в полимерната матрица чрез зол-гел метода. Първоначално, органоалкоксисиланите са хидролизирани във водна среда в присъствие на киселинен катализатор. При тази хидролиза настъпва превръщане на алкоксидните (OR: хидроксилни, амино и тиолни групи) в хидроксилни (-OH) групи, водейки до формирането на силанолните групи. След изливане на разтвора настъпва поликондензация, при който процес се образуват Si-O-Si връзки и се освобождава вода или алкохол в зависимост от степента на хидролиза. Наличието на хидроксилни групи в повтарящите се звена на ПВА предполагат образуването на силни вторични взаимодействия с остатъчните силанолни групи, получени от киселинно катализирана хидролиза и поликондензация на органосиланите без получаване на странични продукти. Получените хибридни материали са охарактеризирани с подходящи анализи като трансмисионна електронна микроскопия (TEM), сканираща електронна

микроскопия (SEM) и спектрални анализи като инфрачервена спектроскопия (FTIR) и UV-Vis анализ.

Хибридните материали на основата на ПВА/AgNps/APTEOS са тествани за фунгицидна активност срещу следните еталонни щамове: *Candida albicans ATCC 10231, Candida krusei ATCC 6258, Candida tropicalis B 6030413, and Candida glabrata ATCC 90050* и срещу клинични щамове изолирани от пациенти с инфекции на пикочните пътища: *Candida glabrata 8–122, Candida.albicans 8–127, Candida albicans 8–137, Candida krusei 8–126,* с ясно наблюдавани зони на инхибиране. Последващо, получените хибридни материали са тествани за имобилизиране на дрождеви клетки и е установено, че те притежават висока ефективност на отстраняване на манганиеви йони (Mn^{2+}) дори и при най-ниската концентрация на сребърни наночастици в матрицата .

Хибридните материали на основата на ПВА/AgNps/МПТЕОС са тествани срещу Грам положителните *Staphylococcus aureus* и Грам отрицателните *Escherichia coli* бактерии, чрез дисково дифузионния метод, показвайки силна антибактериална активност, чийто ефект се засилва с увеличаване на съдържанието на сребро в ПВА/МПТЕОС матрицата.

Изследвани са и термичните свойства на хибридни материали на основата на ПВА/AgNps/TEOC чрез термогравиметричен анализ (TGA) и диференциално сканираща калориметрия (DSC), при което е установено, че въвеждането на TEOC в полимерната матрица подобрява термичната стабилност на получените материали, а включването на AgNps в хибридна ПВА/TEOC матрица значително увеличава тяхната термична устойчивост. Наличието на фунгицидна активност на получените ПВА/AgNps/TEOC филми е проведено срещу пет клинични щама от вида *Candida*: *Candida albicans ATCC 10231, Candida krusei ATCC 6258, Candida tropicalis B 6030413* и *Candida glabrata ATCC 90050*. Установено е, че ПВА/AgNps/TEOC филмите с концентрация на сребро в диапазонът от 0,9 mg/mL до 3,6 mg/mL притежават фунгистатична активност срещу *Candida albicans ATCC 10231, Candida krusei ATCC 6258, Candida tropicalis B 6030413* и фунгицидно активност спрямо *Candida glabrata ATCC 90050*. С повишаване на концентрацията на сребро до 18 mg/mL в ПВА/AgNps/TEOC филмите, активността спрямо *Candida albicans ATCC 10231, Candida krusei ATCC 6258* и *Candida tropicalis B 6030413* стават фунгицидни.

От получените резултати може да се заключи, че синтезираните нови хибридни материали с изявена антимикробиална активност могат да намерят потенциално приложение в различни области на биотехнологиите и медицинското инженерство.

1.2. Синтез на сребърни наночастици, стабилизирани с поливинилов алкохол за ветеринарни приложения (публикации 4).

Синтезирани са сребърни наночастици, които са стабилизирани чрез поливинилов алкохол (ПВА). Това е постигнато чрез термична редукция на сребърни йони в разтвор от ПВА до сребърни наночастици. Полученият комплекс на основата на

ПВА/AgNps е изследван за лечението на външен отит (възпаление на ушната мида и външен ушен канал) при кучета като допълнителен компонент в търговски продукт “Бетазон Трио” “Антибиотик-Разград”. Експериментално е потвърдено, че полученият иновативен кремообразен продукт с добавен ПВА/AgNps материал с концентрация на сребро от 600 mg/L в търговския продукт „Бетазон Трио” подобрява микробната хомеостаза и осигурява положителен ефект при инфекцията на външния ушен канал, когато лечението се прилага веднъж дневно за период от 14 дни.

2. **Получаване на „призрачни“ ваксини за ветеринарно приложние на основата на сребърни наночастици, стабилизирани с поливинилов алкохол (публикации 3 и 5)**

Получаването на „призрачни ваксини“ чрез инактивиране на различни щамове бактерии Salmonella или от вида *E. coli O104, E. coli O157H7* с хибриден материал на основата на сребърни наночастици, стабилизирани с поливинилалкохол (ПВА/AgNps) е иновативен нов подход към приложението на инактивирани ваксини със запазена цялост на клетъчната повърхност. Използването на ваксини, третирани по този начин има редица предимства, като запазване на антигенния диапазон и създаване на комплексен защитен имунитет. Първоначално е определена минималната бактерицидна концентрация (MBC) за различните щамове *Salmonella* или *E. Coli* чрез метода на макроразреждане. Установени са и минимални нетоксични концентрации на ПВА/AgNp хибридния комплекс и клетъчна жизнеспособност (CD_{50}). Специфичният титър на всички получени след имунизация с “призрачната” Salmonela ваксина заешки антисеруми е определена чрез реакцията на Gruber, като щамовете *S. Enteritidis, S. Newport-Puerto Rico* и *S. Typhimurium* са избрани като подходящи кандидати за тяхното включване, с оглед създаването на поливалентна Salmonella „призрачна“ ваксина за ветеринарна употреба. Добавянето на повече щамове към ваксината дава възможност да се разшири обхвата й, а тяхното инактивиране от ПВА/AgNps комплекса ще позволи запазване на пълен набор от антигенни детерминанти, като по този начин ще осигури пълна защита. Получените по този начин антигени могат да намерят потенциално приложение в производството на ваксини.

3. **Дизайн, синтез и охарактеризиране на полимерни мицели с включени златни наночастици (публикации 11,12,13).**

Използването на златни наночастици в медицината, биомедицината и биологията намира широко приложение. Те могат да се прилагат за диагностика и терапия, имуноанализ, клинична химия, откриване и фототермолиза на микроорганизми и ракови клетки и тъкани, целево доставяне на лекарства и други. Получаването на наноструктури с включени златни наночастици е широко използвано за диагностика и терапия на рак. Те представляват голям интерес за фототермичната терапия поради тяхната силна и регулируема линейна абсорбция в близката инфрачервена област, където проникването в тъканите може да бъде максимално увеличено. От друга страна е известно, че полипиридините като поли (2-винилпиридин) (P2VP) и поли (4-

винилпиридин) (P4VP) са неразтворими във вода при неутрално или алкално pH, но при pH <5 се протонират и следователно блок съполимерите на основата на полипиридини могат да реагират на промените на pH в средата. Освен това, те са в състояние да образуват комплекси с различни метални йони като злато, сребро и други. Използването на поли (етилен гликол) е подходящ избор като втори градивен елемент за получаването на блок съполимери, тъй като той е хидрофилен полимер, водоразтворим, биосъвместим и ниско токсичен. Ето защо, са синтезирани и получени серии от добре дефинирани диблокови и триблокови съполимери на основата на поли (етилен гликол) и поли (4-винил пиридин) (PEG-b-P4VP) и (P4VP-b-PEG-b-P4VP), чрез радикалова полимеризация с пренос на атом (ATRP). Това е постигнато с помощта на хлор завършен PEG като макроинициатор. Като втори формиращ блок е използван 4-VP в присъствието на CuCl/PMDETA каталитична система. Успешното получаване на блок съполимерите е доказано чрез ^{1}H NMR и FTIR спектроскопия с присъствието на всички характерни сигнали, произтичащи от PEG и 4-VP единиците. Резултатите от гел-проникващата хроматография (GPC) показаха получаването на добре дефинирани блок съполимери с ниска дисперсност, което потвърждава контролирания характер на радикаловата полимеризация. Изследвано е поведението на само-асоциираме на така получените блок съполимери във водна среда. Последващо са включени златни наночастици в ядрото на получените мицели, което е потвърдено от UV-vis, TEM и DLS анализ. Установено е, че диблоковите съполимери формират добре дефинирани сферични мицели, а триблоковите съполимери само-асоциират, формирайки т.нар. “flower-like” мицели. Определена е и цитотоксичността на мицелите с включени златни наночастици срещу MDA-MB-231 ракови клетки на гърдата и L929 фибробласти. Получените резултати показват, че така синтезираните мицели с включени златни наночастици могат да намерят приложение за биомедицински цели.

4. Дизай, синтез и охарактеризиране на нови флуоресцентни полимерни мицели за приложение в биомедицината и медицината (публикации 9, 10, 14, 16, 19).

4.1. Синтез и охарактеризиране на pH чувствителни полимерни мицели с включени флуоресцентни съединения за визуализация и диагностика (публикации 9, 10, 14, 16)

През последните две десетилетия се проявява значителен интерес към полимерните материали, които обратимо или необратимо биха могли да променят физическите и химичните си свойства под въздействието на външни стимули, например като pH, температура, присъствие на специфични йони, светлинно облъчване, механична сила, магнитно поле, електрическо поле и биоактивни молекули. Специално внимание, обаче се обръща на добре дефинирани pH-чувствителни блокови съполимери, които при физиологично pH (7.1-7.3) са стабилни и могат да се самоорганизират в мицеларни структури, а при подкиселяване на средата, контролирано да освобождават лекарството чрез дисоциация на мицелите. Включването на флуоресцентни съединения в тяхната структура дава възможност да се проектират, така че те да могат да се използват като „многофункционални“ мицели,

притежаващи диагностични и терапевтични свойства. Те могат да изобразяват в реално време и едновременно да доставят лекарства или биологични съединения в зависимост от pH на средата.

Ето защо, е синтезирана и проследена сензорната активност на нова pH чувствителна наноструктура, проектирана като водоразтворими флуоресцентни мицели използвайки добре дефиниран амфифилен диблоков съполимер на основата на поли(метилметакрилат)-блок-поли(метакрилова киселина) (PMMA-b-PMAA), чрез присаждане на 1,8-нафталимид-родамин бихромофорна FRET система (RNI) към PMMA блока. RNI-PMMA–b-PMAA адуктът е способен да самоасоциира в мицели с хидрофобно ядро от PMMA, съдържащо ковалентно прикачено флуоресцентно съединение (RNI), и хидрофилна обвивка, съставена от PMAA блока. Новите флуоресцентни мицели са в състояние да служат като високо чувствителни pH индикатори във водна среда и за успешното интернализиране в HeLa и HEK клетки. Освен това те показват клетъчна специфичност и значително по-висока фотостабилност от тези белязани с чисто органично багрило, като BODIPY. Ценните свойства на новополучените флуоресцентни мицели показват високия потенциал на пробата за бъдещи биологични и биомедицински приложения.

За получаването на pH чувствителни флуоресцентни полимерни мицели са синтезирани и охарактеризирани и добре дефинирани блок съполимери на основата на поли (tert-бутилакрилат) и поли (n-бутилакрилат (PtBA-b-PnBA) чрез контролирана радикалова полимеризация с пренос на атом, изполвайки PtBA-Br като макроинициатор. Намерени са оптималните условия и съотношения между отделните компоненти в системата, които водят до получаването на добре дефинирани съполимери на основата на PtBA и PnBA. Получените съполимери са охарактеризирани и доказани чрез различни спектрални методи като инфрачервена спектроскопия (FTIR) и ядрено магнитен резонанс (NMR). В резултат на проведения ^{1}H ЯМР е определена композицията на получените блок съполимери, а резултатите от гел-проникващата хроматография (GPC), показаха получаването на блок съполимери със сравнително ниска дисперсност. Последващо е, проведена селективна хидролиза на PtBA-b-PnBA блок съполимерите, в резултат на което са получени амфифилни pH чувствителни блок съполимери на основата на полиакрилова киселина (PAA) и n-бутилакрилат (PnBA), които са доказани със спектрални методи. Успешно е проведена модификация на получения амфифилен съполимер с подходящо флуоресцентно съединение: 4-амино (2-аминоетил)-дихидроимид-азонафталимид (DHI) при определени молни съотношения и реакционни условия, в резултат на което са получени флуоресцентни съполимери с ковалентно прикачване на флуоресцентното съединение към PAA блок. Последващо, е изследвана и способността за самоасоцииране на получените pH-чувствителни флуоресцентни амфифилни диблокови съполимери във водна среда, при което са получени pH-чувствителни мицели с модифицирана PAA обвивка чрез флуоресцентно съединение и ядро състоящо се от хидрофобния PnBA блок. Получените наноразмерни мицели са охарактеризирани и доказани с помощта на динамично светлоразсейване (DLS) и трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Проследени са и фотофизичните свойства на получените флуоресцентни мицели, при което е установен

стабилен флуоресцентен сигнал в pH прозорец 5-8, който бързо намалява след понижаване на pH от pH=5 до pH=2.

Изследвана е и способността за получаване на PAA-b-PnBA мицели с включено флуоресцетно съединение на основата на 1,8-нафталимид (NI) в хидрофобното PnBA ядро на мицела. Установено е, получаването на наноразмерни флуоресцентни мицели доказани с помощта на динамично светлоразсейване (DLS) и трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Проследени са и фотофизичните свойства на получените флуоресцентни мицели, при което е установено, че в алкална или неутрална среда pH- чувствителните мицели са стабилни и флуресцентните съединения в ядрата им притежават зелена емисия, което се дължи на тяхната агрегацията в ядрото на мицела. В кисела среда, в резултат на дестабилизирането на мицелите в системата се освобождават единични флуоресцентни съединения, при което се наблюдава синя мономерна 1,8-нафталимидна емисия. Проведените тестове за цитотоксичност на получените флуоресцентни мицели показват, че те притежават ниска цитотоксичност при определени концентрации. Установено е, че получените мицели проникват в цитоплазмата на клетките и проявяват характерните си свойства, в зависимост от средата, и могат да бъдат използвани за биомедицински цели.

Получени са и нови биосъвместими водоразтворими флуоресцентни мицели с включени флуорофори на основата на перилен диимиди (PDI) в хидрофобното ядро на мицела за вътреклетъчни приложенията чрез самоасоцииране на амфифилни поли(винилалкохол)-блок-поли(акрилонитрил) (PVA-b-PAN) съполимери в присъствието на синтезираните флуорофори. Амфифилните PVA-b-PAN съполимери са получени чрез селективна хидролиза на добре дефиниран поли(винил ацетат)-блок-поли(акрилонитрил) (PVAc-b-PAN) съполимер. Успешното получаване на новите флуоресцентни мицели, състоящи се от PVA хидрофилна обвивка и PAN хидрофобно ядро с включени PDI флуорофори, е потвърдено от DLS и TEM анализи. Тествана е цитотоксичността на водоразтворимите флуоресцентни мицели и тяхното интернализиране в живите клетки в зависимост от мицеларната концентрация. Доказано е, че те могат успешно да навлизат в живите клетки, без да се разрушава тяхната морфология.

Получените резултати показват, че новите водоразтворими флуоресцентни мицели с включени флуорофори биха били подходящи за потенциални приложения в биомедицината и медицината.

4.2.Синтез и охарактеризиране на нови флуоресцентни полимерни мицели с включено биологично активно лекарство за лечение на ракови заболявания (публикация 19)

Успешно са разработени флуоресцентни мицеларни наноносители с контролирано освобождаване на ново противораково лекарство, които да позволят едновременно вътреклетъчно изобразяване и лечение на рак. Наноразмерните флуоресцентни мицеларни системи с включено ново противораково лекарство са получени чрез самоасоцииране на добре дефинирани блокови съполимери на основата на получен амфифилен поли(акрилова киселина)-блок-поли(n-бутилакрилат) (PAA-b-PnBA)

съполимер чрез радикалова полимеризация с пренос на атом (ATRP) и хидрофобно противораково бензимидазол-хидразоново лекарство (BzH). Чрез този метод са получени добре дефинирани наноразмерни флуоресцентни мицели, състоящи се от хидрофилна PAA обвивка и хидрофобно PnBA ядро, с включено BzH лекарство в резултат на хидрофобни взаимодействия, постигайки по този начин много висока ефективност на капсулиране. Размерът, морфологията и флуоресцентните свойства на свободните и натоварените с лекарство мицели са изследвани с помощта на динамично разсейване на светлината (DLS), трансмисионна електронна микроскопия (TEM) и флуоресцентна спектроскопия. Спектрофотометрично е определено, че след 72 часа инкубация, заредените с лекарство мицели освобождават 3,25 μM BzH. Установено е, че мицелите, натоварени с BzH лекарството, проявяват засилени антипролиферативни и цитотоксични ефекти върху MDA-MB-231 клетки, с дълготрайни ефекти върху организацията на микротубулите, с апоптотични промени и преференциална локализация в перинуклеарното пространство на раковите клетки. Обратно, антитуморният ефект на BzH самостоятелно или включен в мицели върху неракови клетки MCF-10A е относително слаб.

Получените резултати ни дават основание да считаме, че новите мицели, с включен бензимидазол-хидразон, представляват една нова система за освобождаване на антитуморни лекарства, която има висок потенциал за прилагане в противораковата терапия.

5. Получаване на иновативни антибактериални покрития на основата на нови фотоактивни наногелове (публикации 6, 8, 15, 17, 18).

Поради нарастващия брой на инфекциозни заболявания, причинени от патогенни или условно патогенни микроорганизми с множествена резистентност към антибиотици от различни групи, редица изследователски групи насочват дейността си към откриване на алтернативни и по-ефективни продукти, които да притежават „постоянна“ антибактериална активност“ без риск от генериране на резистентност към тях. През последните години светлинно активираните антимикробни покрития, съдържащи органични и/или неорганични фотосенсибилизатори, се считат за обещаващи продукти, които притежават непрекъсната антибактериална активност срещу бактерии, вируси и гъбички. Това се дължи на свойството на фотосенсибилизаторите да абсорбират светлинна енергия с подходяща дължина на вълната, която предават на околните молекули (основно кислород), образувайки по този начин реактивни кислородни видове (ROS) (радикали и синглетен кислород). Тези силно реактивни видове са отговорни за унищожаването на атакуваните клетки. От изключително значение е получените покритията да притежават необходимия набор от изисквания, така че да изпълняват ефективно своята дейност. Те трябва да бъдат с добра адхезия към повърхността, да притежават добра механична издръжливост, и същевременно да осигуряват възможността за подходящо функционализиране с различни по своята си същност съединения, които да изпълняват зададената им функция. Ето защо, основната ни цел бе насочена към създаването на нов тип високоефективни само-дезинфекциращи се покрития, които ще могат да бъдат успешно използвани в редица области от обществения живот имайки значителен положителен

ефект върху здравето и качеството на живот и е със значима социална важност, както в обществен, така и в икономически аспект.

4.1. Получаване на полимерни покрития върху подложка от неръждаема стомана и изпитване на техните химични и физикомеханични свойства. (публикация 6)

За получаване на подходящи полимерни покрития е използван поликатионния съполимер на основата на (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер, който се състои от P(mDOPA) блок, съдържащ 3,4-дихидрокси-L-фенилаланинови групи (DOPA), които са основен компонент на природно продуцирани протеини секретирани от мидите (MAPs), които се отличават с отлични адхезионни свойства. По този начин отпада необходимостта от допълнително функционализиране на основната полимерна верига с DOPA единици, което е от изключително голямо значение за индустриални приложения. Структурата на получения съполимер е доказана с различни спектроскопски анализи като твърдо фазова инфрачервена спектроскопия (ATR-FTIR) и ядрено магнитен резонанс (^{1}H NMR) с появата на всички характерни сигнали за двата блока от съполимера. Последващо са получени наногелове на основата на полиметакриламид съдържащ 3,4-дихидрокси-L-фенилаланинови (DOPA) групи (P(mDOPA). Условията за получаване на наногелове са критични за успешното им формиране. Необходимо е получените (DOPA) групи от основната P(mDOPA) верига да бъдат в окислено състояние, с оглед формирането на водоразтворим Pox(mDOPA) полимер. Това е постигнато чрез окисление в базични условия, след което е добавен полиалиламин, съдържащ амино групи, които взаимодействат с хиноновите групи от P(mDOPA) чрез добре известните амин-хинонови взаимодействия. В кисела среда, тази реакция е невъзможна, поради протониране на амино групите от PAH, в резултат на което не може да настъпи омрежване на филма. За потвърждаване формирането на наноразмерни частици са използвани динамично разсейване на светлина (DLS) и трансмисионна електронна микроскопия (TEM), които доказват получаването на добре дефиниран наногел. Последващо са получени полимерни покрития върху избрана подложка от неръждаема стомана чрез “deep coating” процедура, състояща се в последователното потапяне на използваната подложка във водни разтвори на поликатионния (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер (2g/L, pH 7) и в (Pox(mDOPA)/PAH) (1 g/L, pH 9) воден разтвор на наногела за определен период от време. Установено е, че подходящото време за отлагането на двата последователни слоя е 15 мин., със стъпка на промиване с дестилирана вода между двете отлагания, което е потвърдено и от анализа проведен чрез кварцово кристална микровезна (QCM-D) в реално време, чрез измерване варирането на резонансната честота (Df) с времето, която проследява онлайн отлагането на продукти, въз основа на което може да се направи оценка дали покритието остава на повърхността след изплакване на покритието. Намаляването на Df с времето доказа успешното отлагане на всеки слой. Проведеният ATR-FTIR анализ също доказа получаването на полимерното покритие върху SS подложка с появата на всички характерни сигнали за Pox(mDOPA)/PAH наногела. Повърхностните и механични свойства на получените покрития са определени чрез атомно силова микроскопия (AFM), микротест за устойчивост на надраскване и сканиращата електронна микроскопия (SEM) и наноиндентация. За

оценка на грапавостта е използвана атомно силова микрокопия, при което е установено намаляване на грапавостта с всеки отложен слой, с установено епитаксиално отлагане на всеки слой следвайки морфологията на подложката. Изпитването на устойчивостта на надраскване е един от най-широко използваните и известни методи за оценка на силата на адхезия на системата покрития-подложка. В резултат на проведените анализи е установено, че получените покрития показват добра устойчивост на надраскване и адхезивна здравина на покритията върху използваната подложа от SS, което се потвърждава и от SEM анализ на получените драскотини, който показва линейно нарастваща драскотина на полимерните покрития, отложени върху SS подложка, което е в съгласие с наблюдаваните промени в сигнала на акустичната емисия от теста за микронадраскване. Тестовете от наноиндентация, потвърждават получаването на покрития с добри механични показатели.

5.2.Синтез на фотосенсибилизатори и модифициране на полимерни покрития (публикация 15)

За създаването на фотоактивни полимерни покрития и успешното им модифициране е избран фотосенсибилизатор: 9-аминоакридин, който притежава добра антибактериална и фотобактерицидна активност, използвайки видима или UV светлина За да се проведе модификацията и получаването на фотоактивни антибактериални покрития, избраният фотосенсибилизатор е подходящо модифицирани с оглед създаването на функционални амино групи, чрез които да се осъществи ковалентното присъединяване към получените полимерни покрития чрез амин/хинонови взаимодействия. Проведените ATR-FTIR и NMR анализи потвърждават успешната модификация на 9-аминоакридина. Изследвано е и фотофизичното поведение на получения амино модифициран 9-аминоакридин, които анализи потвърждават успешната модификация, показвайки, че аминогрупата в акридина е претърпяла успешна трансформация до амид. Получаване на фотоактивно полимерно покритие върху подложка от неръждаема стомана е проведено в последователно депозиране на трите основни компонента: 1)поликатионния разтвор на (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+}) съполимера (2g/L, pH 7); 2) (Pox(mDOPA)/PAH) (1 g/L, pH 9) воден разтвор на наногела и 3) разтвор на амино модифицирания 9-аминоакридин, всеки от които е последван от стъпка на промиване с дестилирана вода, необходим за отмиване на нереагиралите компоненти от системата, използвайки вече описаната процедура. Резултатите от QCM-D експеримента показват, че и трите компонента са успешно отложени върху подложката и остават върху нея, дори след промиване с вода. Топографията на повърхността е определена чрез атомно силова микроскопия, при което е установено, че всеки слой се отлагат епитаксиално следвайки морфологията на образеца. За да се оценят механичните свойства на получените фотоактивни покрития са проведени тестове на устойчивост на надраскване на повърхността и наноиндентация за определяне на твърдостта и модула на еластичност. Процесът на надраскване е проследен чрез промяната на емисията на акустичния сигнал, при което е установено, че получените покрития притежава добра адхезия при ниски натоварвания до 15mN. Проведените SEM анализи на получените драскотини в резултат на проведените изпитания на устойчивост на надраскване показват линейно нарастваща драскотина върху фотоактивните полимерни наногелни

покрития, без да се наблюдава напукване или разслояване на покритията по време на надраскването. Механичните свойства на получените фотоактивните полимерни покрития, нанесени върху SS подложка са тествани чрез наноиндентацията, използвайки Беркович индентор при максимално натоварване от 20 mN. В резултат на наноидентацията са установени по-добри механични свойства на получените полимерни покрития върху SS спрямо покритията наногел-подложка.

5.3.Дизайн и синтез на фотоактивни полимерни покрития с включени фотосенсибилизатори и метални наночастици (публикации 8,15,17,18)

Синтезирани са сребърни наночастици, които успешно са включени в полимерен наногел на основата на полиметакриламид съдържащ 3,4-дихидрокси-L-фенилаланинови (DOPA) групи (P(mDOPA) и полиалиламин (PAH), съдържащ първични амино групи (Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH). Полученият Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH) наногел е охарактеризиран с подходящи техники като трансмисионна електронна микроскопия (TEM), динамично разсейване на светлина (DLS) и електронна дифракция в селектирана област (SAED), които ясно показват формирането на сребърни наночастици включени в полимерния наногел. Получаването на полимерно покритие върху подложка от неръждаема стомана (SS), чрез “deep coating” процедура, с използването на поликатионния (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер и Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногела е доказано чрез енергийно-дисперсивен рентгенов анализ и сканираща електронна микроскопия (EDX-SEM). Установено е присъствието на сребро, въглерод, кислород и азот върху субстрата, които произтичат от Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногела. Механичните свойства на полученото покритие са определени чрез микротест за устойчивост на надраскване и сканиращата електронна микроскопия, наноиндентация и високоскоростна наноиндентация. В резултат на проведените анализи е установено, че получените покрития притежават добра адхезия, устойчивост на надраскване и добри механични свойства.

За получаването на фотоактивни полимерни покрития с включени сребърни наночастици е проведена функционализация на полимерното покритие с фотосенсибилизатор на основата на протопорфирин, който е предварително модифициран с оглед създаването на амино групи в структурата. Получаването на амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED) е доказано чрез различни спектроскопски анализи като ATR-FTIR, ^{1}H NMR, UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия. Повърхностните и механични свойства на получените фотоактивни антибактериални покрития са изследвани с помощта на енергийно-дисперсивен рентгенов анализ и сканираща електронна микроскопия (EDX-SEM), микротест за устойчивост на надраскване и сканиращата електронна микроскопия, наноиндентация и високоскоростна наноиндентация (XPM). EDX-SEM анализът показа наличието на въглерод (C), кислород (O) и азот (N), с по-слабо изразено присъствие на сребро. Проведеният тест за микронадраскване показва по-висока устойчивост на надраскване и по-добра адхезия на покритието към SS субстрата спрямо полимерното покритие с включени сребърни наночастици. Потвърждение за това са и получените по-добри механични показатели, в резултат на проведената наноиндентация и XPM. За да се

направи съпоставка в свойствата на покритията без и с наличие на сребърни наночастици във втория полимерен слой, са получени покрития, при които втория полимерен слой се състои от омрежен Pox(mDOPA)/PAH наногел, а последният от амино модифицирания протопорфирин. От проведените механични изпитания е направен извода, че най-добри адхезивни и механични показатели притежават покритията, които се състоят от Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и последен слой състоящ се от амино модифицирания протопорфирин.

Получени са и фотоактивни покрития, при които последният слой е съставен от протопорфирин с включени сребърни наночастици. За целта е синтезиран комплекс от амино модифициран протопорфирин IX с включени сребърни наночастици, който е доказан с флуоресцентна спектроскопия, ATR-FTIR, TEM и SAED анализи. Механичните свойства на получените покрития определени чрез наноиндентацията показват близки по стойност, но не толкова добри показатели в сравнение с покритията, които се състоят от Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и последен слой състоящ се от амино модифицирания протопорфирин.

5.4. Тестване на антибактериалните свойства на модифицирани полимерни покрития (публикации 8, 15, 17, 18)

Антибактериалните свойства на модифицираните с фотосенсибилизатори полимерни покрития са определени срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, чрез дисково дифузионен метод (DDM). Резултатите показват, че всички покрития притежават силна антибактериална активност, която е по-ясно изразена спрямо Грам-отрицателните бактерии, което е резултат от разликите в структурата на мембраната си, най-характерните от които е дебелината на пептидогликановия слой. С най-изявени антибактериални свойства се отличават покритията, които се състоят от Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и фотосенсибилизатор на основата на порфирин, както и тези, при които последния слой е изграден от комплекс от амино порфирин/сребърни наночастици. Получените по-добри резултати за тези покрития предполагат, че антибактериалната активност е резултат от комбиниран ефект от фотодинамичната активност на фотосенсибилизатора и неговата антибактериала активност, както и на антибактериалната активност на сребърните наночастици, което се дължи на алтернативен механизъм на действие.

Получените фотоактивни антибактериални покрития и изявената им активност спрямо Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии е от изключително социално значения с оглед нарастващата резистентност на голям брой микроби към традиционно използваните препарати.