ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ПОЛИМЕРНО ИНЖЕНЕРСТВО”

инж. Николета Драгомирова Филипова

ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИБАКТЕРИАЛНИ ФОТОАКТИВНИ ПОЛИМЕРНИ ПОКРИТИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 4.2. Химически науки
(Химия на високомолекулярните съединения)

Научен ръководител: проф. д-р инж. Райна Бряскова

Научно жури:
1. ……. - председател
2. ……. - рецензент
3. ……. - рецензент
4. …….
5. …….

София, 2024

Дисертационният труд е написан на 131 страници, съдържа 53 фигури и 10 таблици. Цитирани са 188 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Полимерно инженерство”, състояло се на 04.10.2024

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на ..... от ..... часа в зала ....., сграда „.....” на ХТМУ.
Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Номерацията на разделите, фигурите, схемите и таблиците в автореферата съответства на тази в дисертационната работа.

Използвани съкращения

^{13}C NMR - Въглероден ядрено магнитен резонанс

^{1}H NMR – Протонен ядрено магнитен резонанс

AFM – Атомно-силовата микроскопия

AgNPs – сребърните наночастици

ATR-FTIR – Инфрачервена спектроскопия при атенюирано пълно отражение с Фурие трансформация

DLS – Динамично разсейване на светлината

DOPA – 3,4-дихидрокси-фенилаланин

EDC – 1-(3-диметиламино-пропил)-3-етил карбодимид хидрохлорид

EDX-SEM – Енергийно-дисперсивен рентгенов анализ със сканираща електронна микроскопия

MRSA – метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus*

NHS – N-хидрокси сукцинимид

P(mDOPA) – поли (N-метакрилоил 3,4-дихидрокси-L-фенилаланин метил естер)

P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+}) – поли(N-метакрилоил 3,4-дихидрокси-L-фенилаланин)-съ-поли(2-(метакрилокси)етил триметиламониев хлорид) съполимер

PAH – поли(алиламин)

Pox(mDOPA) – поли (N-метакрилоил 3,4-диоксо-L-фенилаланин метил естер)

PPIX – Протопорфирин IX

PPIX-ED - етилендиамино производно на протопорфирин IX

QCM-D – Кварцово кристална микровезна с разсейване

ROS – реактивни кислородни видове

SS – неръждаема стомана

TEM – Трансмисионната електронна микроскопия

I. Въведение

Адхезията на микроорганизми и последващото образуване на биофилми върху различни повърхности е сериозен проблем в обществото както от икономическа, така и от здравна гледна точка. Микроорганизмите под формата на бактерии, вируси, гъбички оказват въздействие върху почти всеки аспект на човешкия живот. Голяма част от човешките заболявания са пряко или косвено свързани с някаква форма на микробна инфекция.

Антимикробната резистентност е способността на микроорганизмите като бактериите да оцеляват и да се размножават в присъствието на антимикробен агент, който нормално би ги инхибирал или убил. Антимикробната резистентност е само една от многото адаптивни черти, които устойчивите бактерии могат да притежават или придобият, което им позволява да преодолеят стратегиите насочени срещу тях. Това, което е най-тревожно днес, е скоростта, с която често се развива антибиотичната резистентност и колко бързо се разпространява сред различни видове бактерии.

Ето защо, редица изследователски групи насочват дейността си към откриване на алтернативни по-ефективни продукти, които да притежават „постоянна“ антибактериална активност без риск от генериране на резистентност към тях. Покритията предизвикат интереса на изследователите през последните десетилетия и тяхната революция ускорява употребата им в различни области, включително като антибактериални средства.

Разработването на ефективни антибактериални покрития е едно от основните настоящи предизвикателства, тъй като наличието на биофилми върху повърхностите е неудобен медицински, икономически и обществен проблем. Усилията на изследователите са насочени към създаването на повърхности с антибактериално покритие, имащи за цел да потиснат образуването на биофилми или чрез убиване на бактерии или чрез предотвратяване на тяхната адхезия към повърхностите. Основните стратегии се основават на повърхностна модификация чрез въвеждане на антибактериални субстанции като антибиотици и антисептици чрез различни техники, които, обаче, са ограничени поради тяхната непълна ефективност, тяхната токсичност или ролята им в появата на мултирезистентни бактерии.

Една нова и интересна алтернатива са повърхности, които каталитично продуцират бактерициди използвайки външно приложена химична, електрична или оптична енергия. Към тази група се отнасят светлинно активираните антибактериални покрития. Именно те, понастоящем предизвикват голям изследователски интерес, поради възможността за непрекъснатата дезинфекция на повърхността, преодолявайки недостатъците на останалите покрития. Този процес е в резултат на облъчване на определени съединения, т.нар.

фотосенсибилизатори с видима светлина, който води до производство на цитотоксични компоненти като синглетен кислород и свободни радикали в резултат на протичащите фотодинамични процеси. Известно е, че фотодинамичната терапия представлява третиране на патогенни клетки, основано на активиране на фотоактивни съединения чрез светлина и е резултат на свойствата на фотосенсибилизаторите да абсорбират светлинна енергия със съответна дължина на вълната, която пренасят до заобикалящите ги молекули (основно до кислородните), формирайки по този начин реактивни форми (радикали и синглетен кислород). Тези силно реактивни частици са отговорни за разрушаване на атакуваните клетки.

Същевременно през последното десетилетие покритията на основата на наногелове от естествени и синтетични полимери привличат вниманието на учените, поради възможността за по-лесното модифициране на повърхностите с тяхна помощ и включването на различни антибактериани съединения в структурата на покритията.

Възможността за използване на наногелове, като подходящи покрития към различен тип повърхности и тяхното пълноценно оползотворяване чрез включване на различни по своята природа фотоактивни съединения е един нов и интересен подход за получаването на ефективни антибактериани покрития.

II. Теза, цели и задачи:

Тезата на настоящата дисертационна работа се състои във възможността за получаване на иновативни и високо ефективни фотоактивни антибактериални покрития, използвайки добре дефинирани функционални наногелове и модифицирани фотосенсибилизатори, които действат на принципа на фотодинамични процеси, които ще имат фундаментален характер.

Целта на настоящата дисертационна работа е да се получат нови фотоактивни полимерни покрития, които да притежават добра адхезионна способност с изявени антибактериални свойства. Въз основа на поставената цел са формулирани следните задачи за изпълнение:

- Дизайн, синтез и охарактеризиране на подходящи полимерни покрития, които да имат добра адхезионна способност към различен по своя тип повърхности и същевременно да притежават подходяща функционалност с оглед на последващата пост-модификация със съединения имащи силна антимикробиална активност.

- Проектиране и синтез на подходящи фотосенсибилизатори, действащи на принципа на фотодинамични процеси, които притежават антибактериална активност.
- Модифициране на получените полимерни покрития с различни класове фотосенсибилизатори и проследяване на физикомеханичните свойства на получените материали към повърхности от неръждаема стомана, в зависимост от начина на формиране на съответното покритие.
- Дизайн и синтез на метални наночастици имащи изразена антибактериална активност включени в полимерния наногел (тип „in") последвано от модификация с подходящи фотосенсибилизатори или формирайки комплекс с модифицираните фотосенсибилизатори. Проследяване на химичните и физикомеханични свойства на получените материали.
- Проследяване на тяхната антибактериална активност спрямо различни Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, в зависимост от начина на получаване на съответното покритие и типа на използвания фотосенсибилизатор.

V. Резултати и дискусия

1. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел върху подложка от неръждаема стомана (SS)

1.1. Синтез на полимерен наногел на основата на (P(mDOPA)/PAH

Наногеловете са получени на основата на полиметакриламид съдържащ 3,4-дихидрокси-L-фенилаланинови (DOPA) групи (P(mDOPA)) синтезиран чрез контролирана радикалова полимеризация използвайки подходящ инициатор, разтворител и реакционни условия (температура, време на полимеризация), с правилен подбор на втори полимер, съдържащ първични амино групи като поли(алиламин) (PAH), които да могат успешно да осъществят омрежване на полимерния слой, чрез амин/хинонови взаимодействия, с оглед да бъде избегнато допълнително прибавяне на омрежващ агент, които би довело до една допълнителна технологична стъпка на пречистване на системата, съгласно методиката на Detrembleur et all [1].

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 поли(алиламин), съдържащ амино групи, които взаимодействат с хиноновите групи от P(mDOPA) чрез добре известните амин/хинонови взаимодействия (Схема 1). 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.

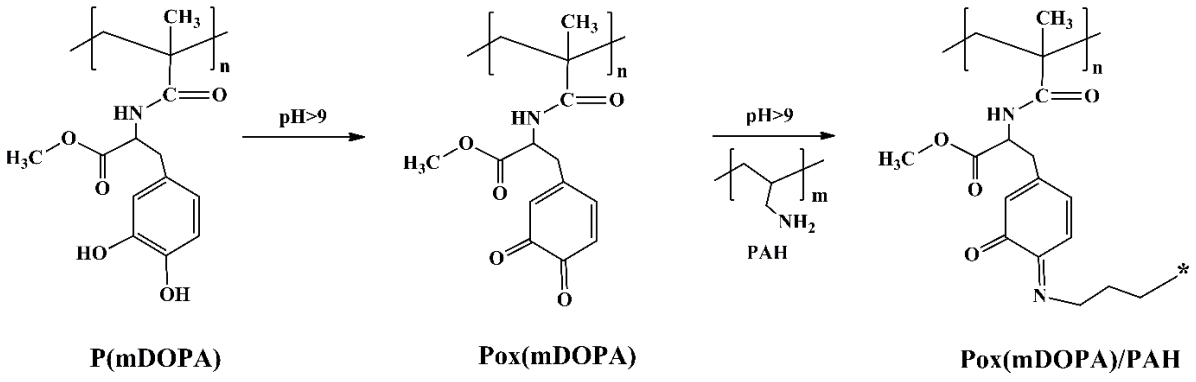
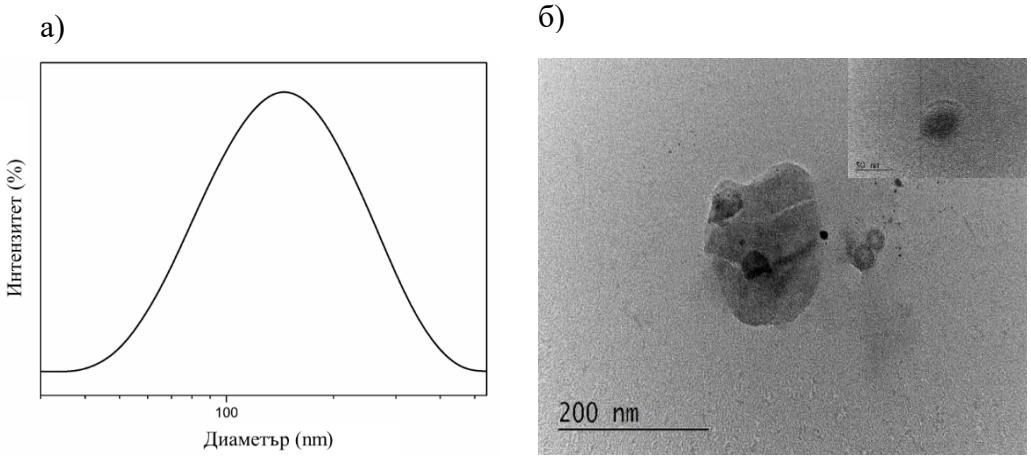


Схема 1: Получаване на наногел на основата на P(mDOPA)

1.1.1. DLS и TEM анализ на получения (Pox(mDOPA)/PAH) наногел

Резултатите от динамичното разсейване на светлина показват получаването на наночастици със среден хидродинамичен диаметър от 120 nm и сравнително широко

разпределение по размер: PDI=0.25 (Фигура 15а). ТЕМ анализът потвърждава формирането на сферични наноразмерни частици със среден диаметър от 50 nm, които са склонни към агрегиране (Фигура 15б).



Фиг. 15: а) DLS анализ на Pox(mDOPA)/PAH наногел; б) ТЕМ снимка на Pox(mDOPA)/PAH наногел

1.2. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел върху подложка от неръждаема стомана (SS)

Получаването на полимерни покритие върху подложка от неръждаема стомана (SS) е осъществен чрез "dip coating" процедура състояща се в последователното потапяне на използваната подложка във водни разтвори на поликатионния (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер ((2 g/L, pH 7) и последващо в (Pox(mDOPA)/PAH) (1 g/L, pH 9) воден разтвор на наногела за определен период от време (Схема 2).

Първоначално субстратът от неръждаема стомана се потапя във воден разтвор на поликатионния P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер, който се състои от 15 mol% DOPA звена (2 g/L, pH 7) при стайна температура. Известно е, че DOPA функционализираните поликатиони може силно да се прикрепят към повърхности чрез DOPA/метал взаимодействия [2].Следващият слой се изгражда чрез потапяне на субстрата във воден разтвор на наногел на базата на Pox(mDOPA)/PAH (1 g/L, pH > 9).

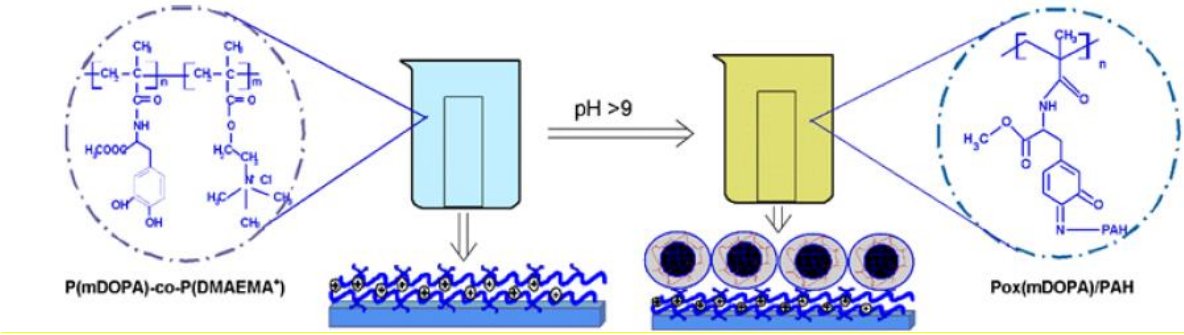
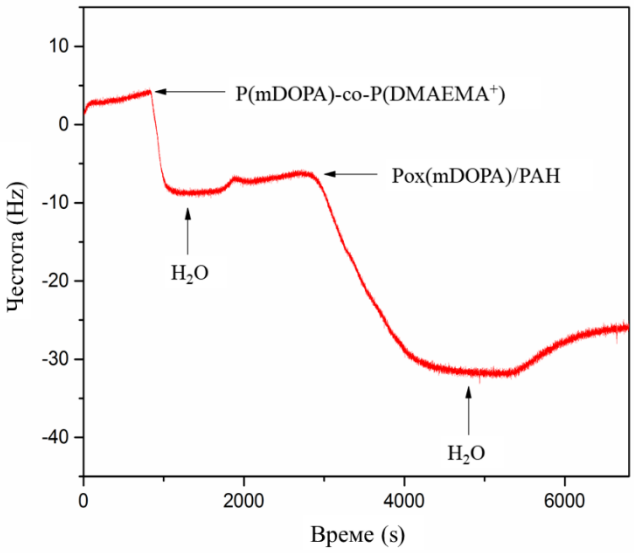


Схема 2: Стратегия за получаване на полимерни наногелни покрития

1.2.1 QCM-D анализ на получените полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел

Отлагането на полимерните слоеве е проследено с използването на кварцово кристална микровезна (QCM-D) в реално време върху SS сензори чрез измерване на вариацията на резонансната честота (D_f) спрямо времето (Фигура 16), въз основа на което може да се направи оценка дали покритието остава на повърхността след промиване с подходящ разтворител. Намаляването на D_f с времето доказва успешното отлагане на съответния слой [3].



Фиг. 16: Промяна на честота с времето при последователното отлагане на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) и Pox(mDOPA)/PAH слоеве. Числото на обертона е 7

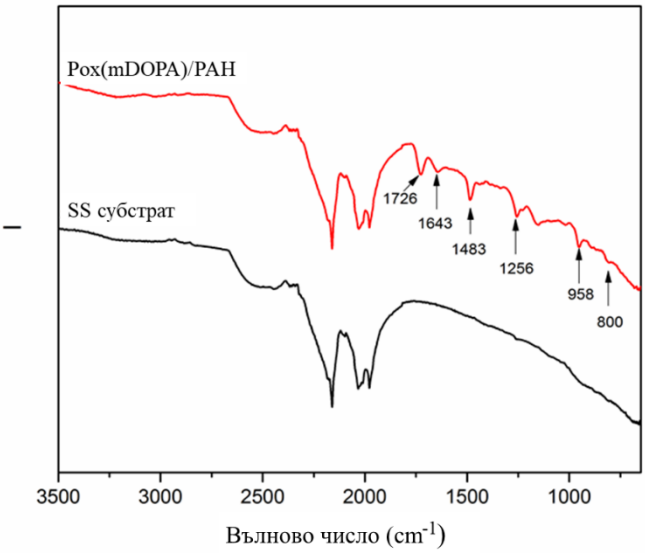
Първоначално като първи слой е въведен водния разтвор на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимера до получаването на стабилна линия, което протича за ~14 мин, след което следва стъпка с промиване с вода. Намаляването на честотата D_f показва успешното отлагане на първия слой с Δm_1=25 ng.cm^{-2} изчислено съгласно уравнението на Sauerbrey. Следващата стъпка е отлагането на втория слой на основата на

Pox(mDOPA)/PAH наногела. Забелязва се, че вторият слой се отлага за по-дълъг период от време ~17 мин. Независимо от наблюдаваното по-бавно отлагане на втория слой, значителното понижаване в резонансната честота след промиване с вода, доказва високо количество на втория отложен слой с Δm_2=65 ng.cm^{-2} [4].

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.

1.2.2. ATR-FTIR анализ на получените полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел

Отлагането на полимерните слоеве върху подложката от неръждаема стомана последващо е доказано с ATR-FTIR спектроскопия. Спектърът показва наличието на всички характеристични за Pox(mDOPA)/PAH сигнали: при 1726 cm^{-1} (C=O), 1643 cm^{-1} за (C=O) от амидната група, 1483cm^{-1} характерни за C-N трептенията и при 1256 cm^{-1} и 800 cm^{-1} характерни за ароматните (C-H) трептения (Фигура 17).



Фиг. 17: ATR-FTIR спектър на подложката (SS) и Pox(mDOPA)/PAH върху SS

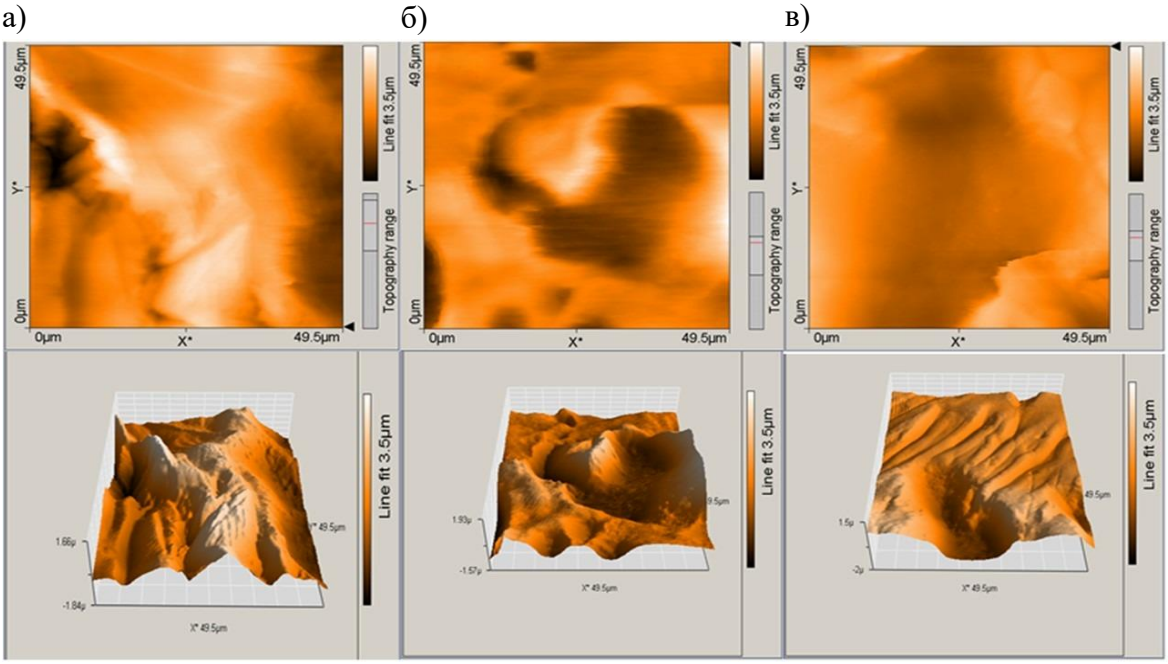
1.2.3. AFM анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH

Доказано е, че топографията на повърхността оказва значително влияние върху прикрепването на бактериите и последващото образуване на биофилм [5, 6]. Ето защо е направено изследване върху грапавостта на получените покритията на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH.

За да се изследва грапавостта на получените покрития е използвана атомно силова микроскопия (AFM) чрез оценка на средноаритметичната височина R_a [7, 8] на получените повърхности, както следва: а) немодифицирана подложка SS (Фигура 18 а), б) подложка модифицирана с P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер (Фигура 18 б) и в) подложка с P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH наногел (Фигура 18 в).

Резултатите показват, че използваната подложка от неръждаема стомана е много грапава с R_a - 347 nm, с най-големи разхождения между две измервани точки. Грапавостта слабо намалява с всеки отложен слой, като за първия слой от P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) тя е 342 nm, а за втория слой от Pox(mDOPA)/PAH грапавостта намалява още със средна стойност на R_a от 302 nm.

Намаляване на грапавостта с всеки отложен слой показва, че те се отлагат епитаксиално следвайки морфологията на подложката.

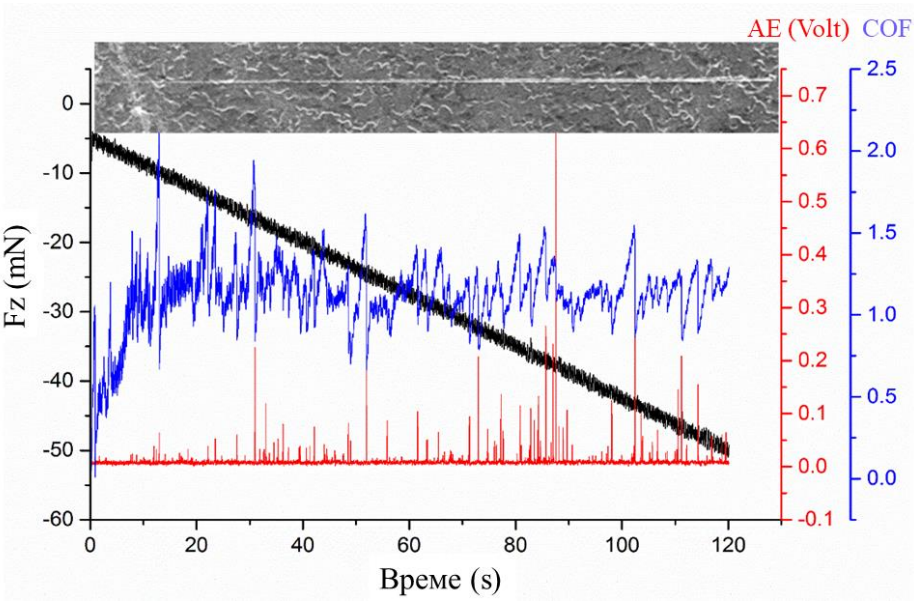


Фиг. 18: Топографски и 3D изображения на покритията получени чрез AFM: а) немодифицирана подложка от SS; б) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер; в) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH наногел

1.2.4. Определяне на устойчивост на надраскване на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH

Изпитването на устойчивостта на надраскване е един от най-широко използваните и известни методи за оценка на силата на адхезия на системата покрития-подложка. При този метод се използва твърд диамант или метален сферичен връх с радиус от 200 µm при непрекъснато прилагане на нарастващо натоварване върху повърхността на покритието. В същото време пробата се измества с постоянна скорост. Надраскването на повърхността

води до увеличаване на еластичната и пластична деформация, докато при дадено критично натоварване настъпи отлепване на покритието от основата. Критичното натоварване обикновено се определя чрез оптична микроскопия, акустична емисия или сила на триене [9]. Ето защо е проведен тест за устойчивост на надраскване на покритието на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH, използвайки UMT (Bruker) модул за изпитване на надраскване с диамантен сферично-коничен връх с радиус на върха (DSH-025, R=2,5 μm) на разстояние от надраскване 5 mm със скорост на надраскване 0,083 mm/s с постепенно увеличаване на натоварването от 5 до 50 mN. Фигура 19 представя средното натоварване, при което покритието се нарушава по време на процеса на надраскване и е проследено чрез промяна в сигнала на акустичната емисия.

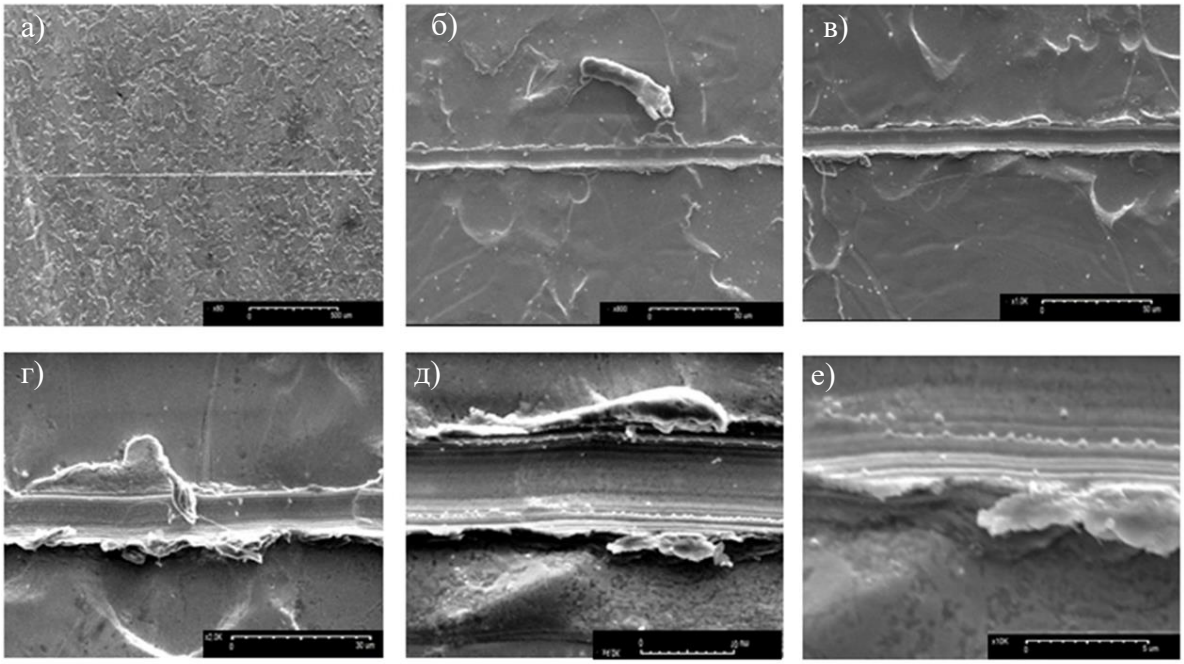


Фиг. 19: Тест за устойчивост на надраскване на полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH върху подложка от неръждаема стомана. Fz -натоварване, AE – акустична емисия; COF – коефициент на триене.

От сигнала на акустичната емисия се вижда, че началото на процеса на надраскване от индентора на отложения полимерен филм започва на 30 сек., което отговаря на сила на натоварване от 15 mN. В диапазона от 30 до 80 сек. отложеният филм показва добра устойчивост на надраскване, който се характеризира с постоянна стойност на акустичната емисия. Тази област отговаря на изменение на силата на натоварване от 15 до 40 mN. Същинското нарушение на полимерния слой започва на 90 сек., където се наблюдава най-високо изменение в силата на акустичния сигнал. След тази граница се наблюдава намаляване на интензивността на акустичната емисия, което съответства на разрушен полимерен слой. Коефициентът на триене е сравнително постоянен през цялото време със

средна стойност от 0.6, което е показателно за това, че полимерния филм има равномерна дебелина.

Проведеният SEM анализ на получените драскотини показва линейно нарастваща драскотина на полимерните покрития, отложени върху SS подложка, което е в съгласие с наблюдаваните промени в сигнала на акустичната емисия (Фигура 20 а-е). Относително малкото количество отломки получените от изпитанието за устойчивост на надраскване и липсата на отлепване или напукване на покритието при непрекъснато нарастващо натоварване от 5 до 50 mN предполага добра устойчивост на надраскване и адхезивна здравина на покритията върху използваната подложа от SS.



Фиг. 20: SEM изображения на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/Pox(mDOPA)/PAH полимерното покритие след провеждане на теста за устойчивост на надраскване.

2. Получаване на фотоактивно полимерно покритие на основата на 9-аминоакридин

2.1. Синтез на амино модифициран 9-аминоакридин

Известно е, че аминоакридинът и неговите производни представляват добри антибактериални и антипаразитни агенти [10] и притежават фотобактерицидна активност, използвайки видима или UV светлина, като по този начин продуцират цитотоксични реактивни кислородни видове (ROS) включвайки супероксидни радикал аниони(O_2 .$^{-}$) и синглетен кислород ($^1O_2$) [11]. Поради изявените си антибактериални и фотоактивни свойства е проведена модификация на 9-аминоакридин, с оглед създаването на подходяща функционална амино група, чрез която да бъде осъществена реакцията на ковалентно

свързване към съответните функционални наногелове чрез амин-хинононови взаимодействия и получаването на фотоактивни полимерни покрития. Синтезът на аминомодифициран аминоакридин е проведен в две стъпки съгласно схема 3.

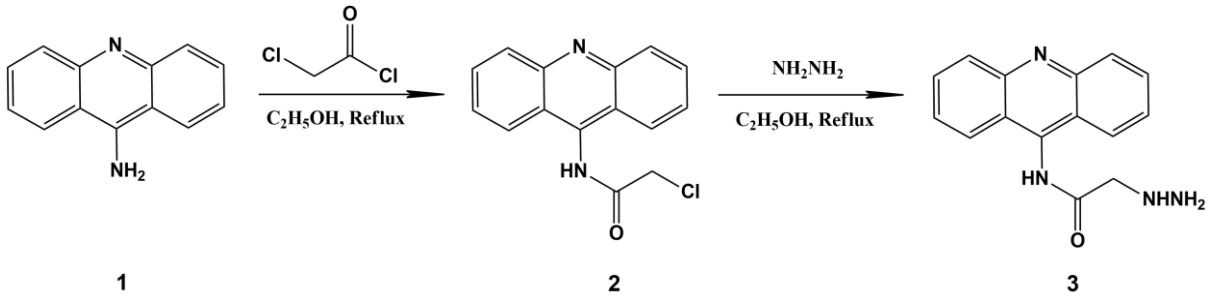
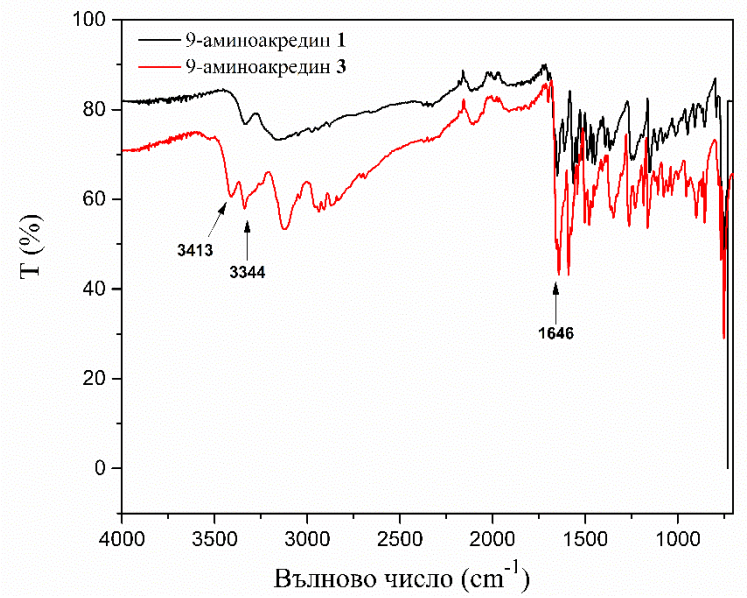


Схема 3: Синтез на амино-модифициран 9-аминоакридин **3**

Полученият 9-аминоакридин **3** е охарактеризиран чрез ATR-FTIR и ядрено магнитен резонанс.

2.1.1. ATR-FTIR анализ на амино модифициран 9-аминоакридин 3

ATR-FTIR спектърът показва наличието на всички характерни за модифицирания продукт сигнали както следва: 3413 и 3344 cm^{-1} характерни за (νNH_2) трептения, които отсъстват в немодифцирания 9-аминоакридин, както и при 1646 cm^{-1} специфични за (νN-C=O) групата (Фигура 21).

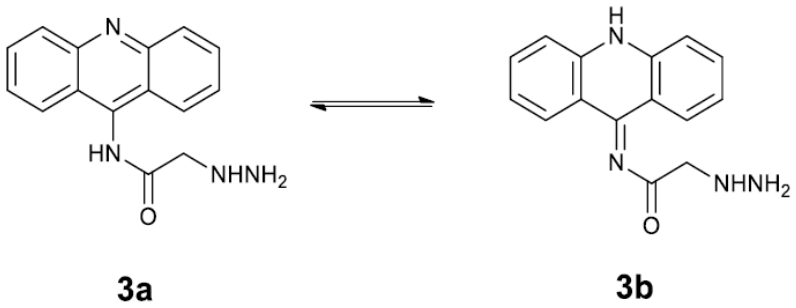


Фиг. 21: ATR – FTIR спектър на 9-аминоакридин и амино модифициран 9-аминоакридин **3**

2.1.2. ^{1}H NMR и ^{13}C NMR анализи на амино модифициран 9-аминоакридин 3

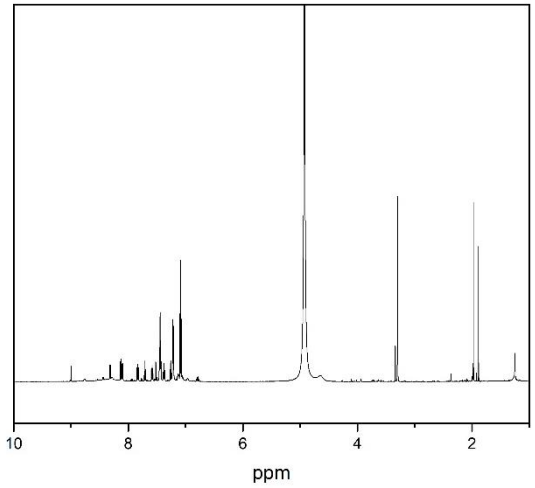
Полученият 9-аминоакридин **3** показва комплексен ^{1}H NMR (Фигура 22) и ^{13}C NMR (Фигура 23) спектър с характерните сигнали за производните на 9-аминоакридина, които се

намират в тавтомерно равновесие [12] (Схема 4), което обаче не променя реактивността на получената амино група в 9- аминоакридина.



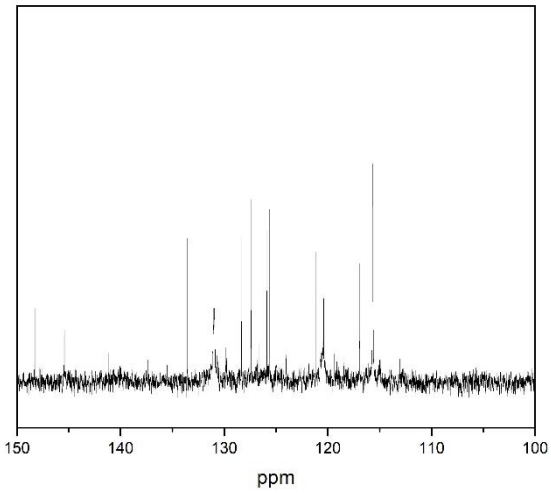
3a **3b**

Схема 4: Тавтомерно равновесие на 9-аминоакридин **3**



Фиг. 22: ^{1}H NMR спектър на амино модифициран 9-аминоакридин **3**

^{1}H NMR (600 MHz, MeOD, смес от тавтомери) ppm: 9.00 (s, 1H, акридин NH 3b), 8.76 (s, 1H, 3a CONH), 8.32 (dd, J = 8.2, J = 1.0 Hz, 2H, акридин 3b H-1, акридин 3b H-8), 8.28 (s, 2H, 2xCH2NH), 8.15 - 8.08 (m, 4H, акридин 3a H-2, акридин 3a H-4, акридин 3a H-5, акридин 3a H-7), 7.83 (dd, J = 8.8, J = 6.6 Hz, 2H, акридин 3a H-3, акридин 3a H-6), 7.71 (dd, J = 8.4, J = 6.9 Hz, 2H, акридин 3b H-3, акридин 3b H-6,), 7.61 - 7.56 (m, 2H, акридин 3b H-2, акридин 3b H-7), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1H, акридин 3a H-1,), 7.38 (dd, J = 8.3, J = 7.0 Hz, 2H, акридин 3b H-4, акридин 3b H-5), 7.26 (d, J = 8.1, 1H, акридин 3a H-8), 4.63 (s, 4H, 2xNHNH2), 1.98 (s, 2H, -COCH2-, 3b), 1.89 (s, 2H, -COCH2-, 3a).



Фиг. 23: ^{13}C NMR спектри на амино модифициран 9-аминоакридин **3**

^{13}C NMR (151 MHz, MeOD, смес от тавтомери) ppm: 178.87, 170.85, 148.27, 145.42, 133.58, 130.90, 128.35, 127.42, 126.68, 125.87, 125.66, 121.19, 120.41, 116.96, 115.66, 19.02, 18.99.

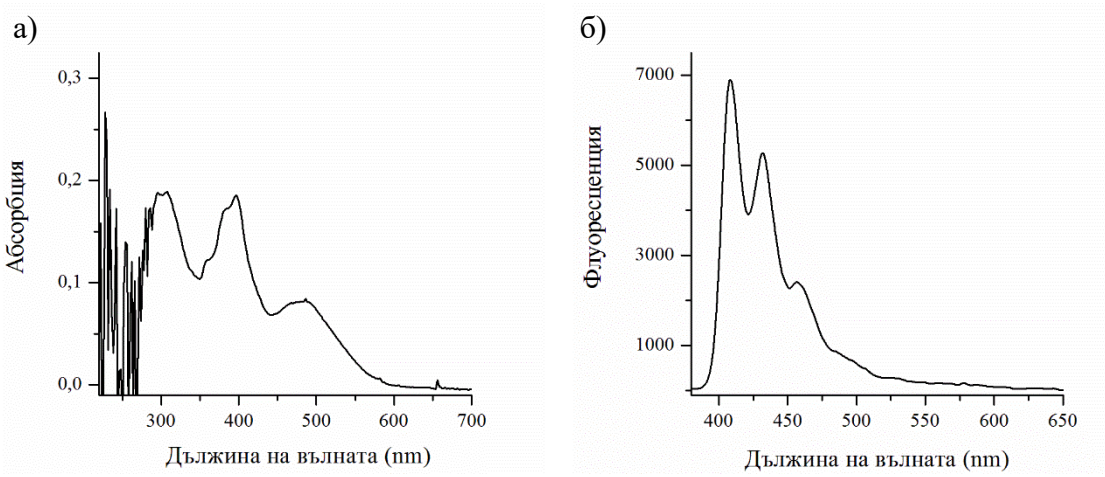
2.1.3. Флуоресцентен анализ на амино модифициран 9-аминоакридин 3

Изследвано е и фотофизичното поведение на получения амино модифициран 9-аминоакридин. Полученият продукт притежава широк абсорбционен спектър в диапазона 300-550 nm с максимум между 390 nm и 404 nm в зависимост от полярността на разтворителя (Таблица 1).

Таблица 1: Абсорбционни и флуоресцентни максимуми на 9-аминоакридин **3** в различни разтворители.

	$CHCl_3$	CH_3CN	DMF	DMSO	EtOH
λ_A (nm)	390	390	396	398	404
λ_F (nm)	400	405	408	411	412

Флуоресцентните му спектри показват интензивна емисия в диапазона от 400 до 500 nm, с ясно изразени максимуми в интервала 400-412 nm. Отчетените стойности на флуоресцентните максимуми са с 20 nm по-малки от тези на изходния 9-аминоакридин, което е ясна индикация че аминогрупата в акридина е претърпяла успешна трансформация до амид. Амидирането на амина в 9-позиция на акридина намалява неговата електронно донорна способност, което от своя страна понижава ефективността на вътрешния пренос на заряд в молекулата и води до хипсохромно отместване на получените спектри (Фигура 24).



Фиг. 24: а) Абсорбционен спектър и б) Флуоресцентен спектър на 9-аминоакридин **3** в DMSO

2.2. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран 9-аминоакредин 3 върху подложка от неръждаема стомана (SS)

Фотоактивните полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран 9-аминоакредин **3** са получени съгласно схема 5, която се състои в последователно депозиране на трите основни компонента, всеки от които е последван от стъпка на промиване с дестилирана вода, необходим за отмиване на нереагиралите компоненти от системата (Схема 5).

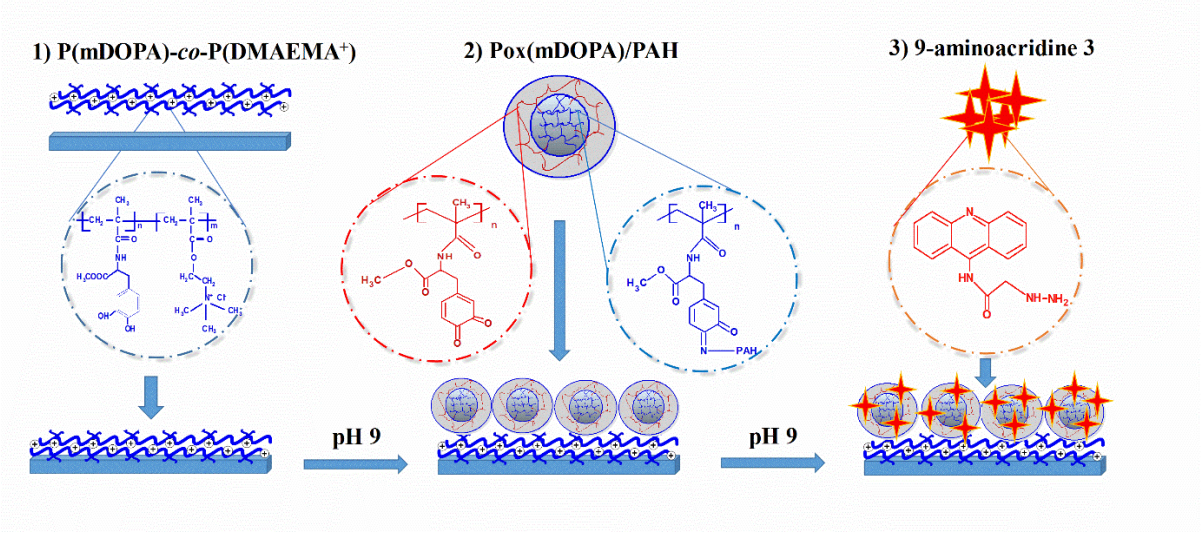


Схема 5: Стратегия за получаване на фотоактивно полимерно покритие Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран 9-аминоакредин **3** върху подложка от неръждаема стомана

Като първи слой отново е използван поликатионен електролитен (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер (2 g/L); За втори слой е използван орто-хинон

функционализирания наногел (Pox(mDOPA)/PAH) (1 g/L, d = 120 nm, PDI = 0.2); Като трети слой е използван разтвор на фотосенсибилизатора (9-аминоакридин **3**) (1 g/L). Полиелектролитният катионен съполимер P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съдържащ около 15 mol% DOPA единици е използван като универсален праймер, за който е известно, че улеснява силното прикрепяне не само на различни полимери, но и на пептиди и ензими към SS [13,14]. Pox(mDOPA)/PAH наногелът е използван, за да се осигури ковалентното прикачване на фотосенсибилизаторът чрез реакция на амино групата от 9-аминоакридин **3** с хиноновите групи, присъстващи в наногела чрез присъединяване по Михаел и/или чрез формиране на Шифова база (Схема 6).

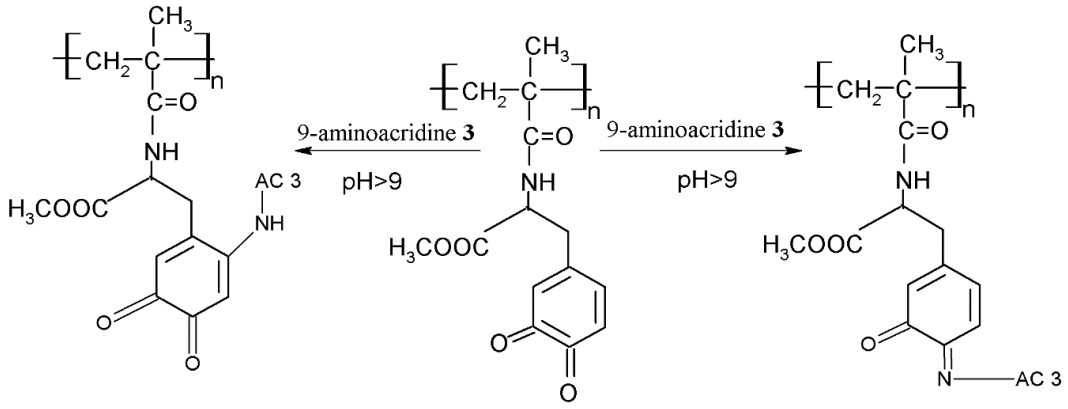
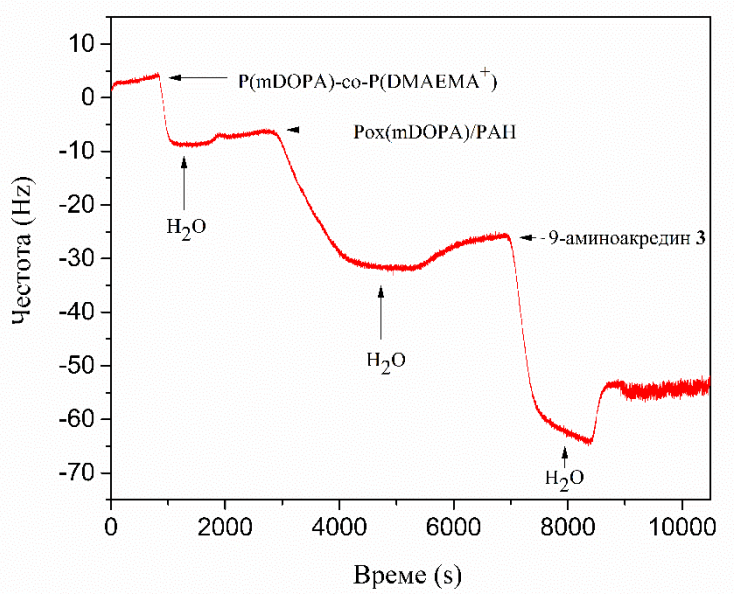


Схема 6: Реакция на амино групата от 9-аминоакридин **3** с хиноновите групи, присъстващи в Pox(mDOPA)/PAH наногела чрез присъединяване по Михаел и/или чрез формиране на Шифова база

2.2.1.QCM-D анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин 3

Отлагането на всеки един слой отново е проследено с кварцово кристална микровезна (QCM-D) в реално време, чрез измерване варирането на резонансната честота (D_f) с времето (Фигура 25). Първоначално през клетката е пропуснат воден разтвор на биомиметичното лепило, P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (2 g L^{-1}) при стайна температура. Рязкото намаляване на честотата свидетелства за отлагането на съполимера, който остава върху субстрата дори след промиване с вода. Използвайки уравнението на Sauerbrey е изчислено количество на отложения съполимер, което е Δm_1=23 ng cm^{-2}. Следващата стъпка е отлагането на втория слой, който се състои от Pox(mDOPA)/PAH наногела. Отново се забеляза по-бавно отлагане на втория слой, но силното понижаване на резонансната честота след отмиване с дестилирана вода, показва голямо количество на отложен продукт: Δm_2=63ng cm^{-2}. Последната стъпка е отлагането на третия фотоактивен слой на основата на 9-аминоакридин **3**. След промиване на клетката с вода е изчислено количеството на отложен продукт: Δm_3 = 69.1 ng cm^{-2}. Резултатите от QCM-D експеримента показват, че и

трите компонента са успешно отложени върху подложката от неръждаема стомана и остават върху нея, дори след промиване с вода.



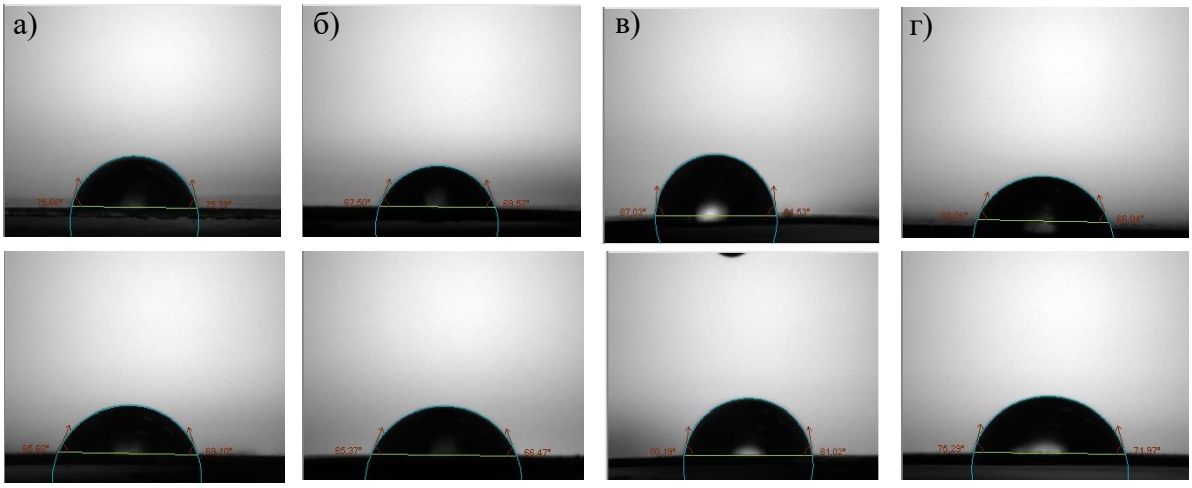
Фиг. 25: Промяна на честота с времето при последователното отлагане на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$), Pox(mDOPA)/PAH и 9-аминоакредин слоеве. Числото на обертона е 7

2.2.2. Определяне на контактен ъгъл на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин 3

Хидрофобността на полученото крайно фотоактивно покритие модифицирано с 9-аминоакридин **3** е определена чрез измерване на контактния ъгъл, който намалява спрямо втория отложен сой от Pox(mDOPA)/PAH наногела (Таблица 2, Фигура 26), което показва, че покритието става по-хидрофилно вероятно, поради наличието на амидни (NH-CO) групи в структурата на 9-аминоакридин **3**, които са склонни да образуват водородна връзка с водните молекули.

Таблица 2: Контактен ъгъл на покритията

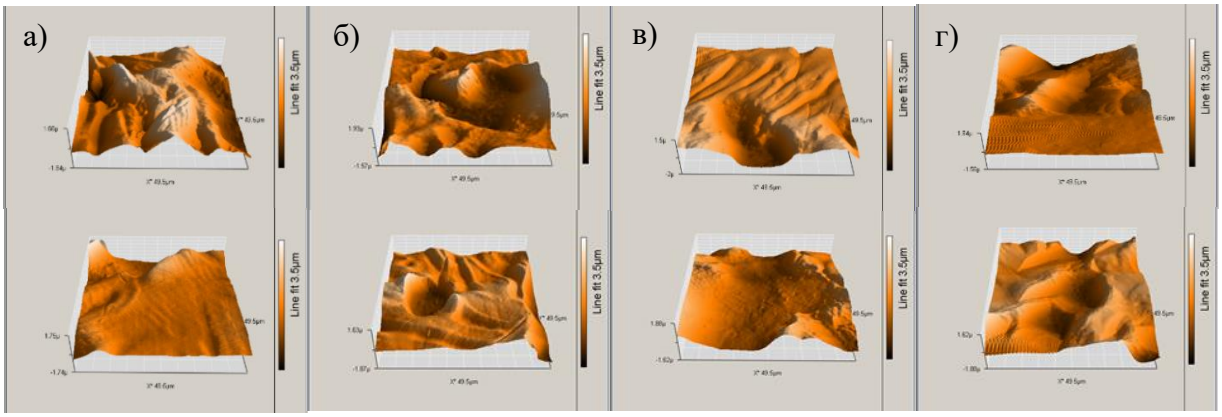
Образец	**Средна стойност**
неръждаема стомана (SS)	71,54
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)	67,23
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH	83.19
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH 9-аминоакридин **3**	70,34



Фиг. 26: Контактен ъгъл на покритията: а) неръждаема стомана SS; б) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер; в) Pox(mDOPA)/PAH наногел; г) 9-аминоакридин **3**

2.2.3. AFM анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин 3

За определяне на грапавостта на получените фотоактивни покрития отново е използвана атомно силова микроскопия (AFM) чрез оценка на средноаритметичната височина R_a на получените повърхности (Фигура 27 а-г).



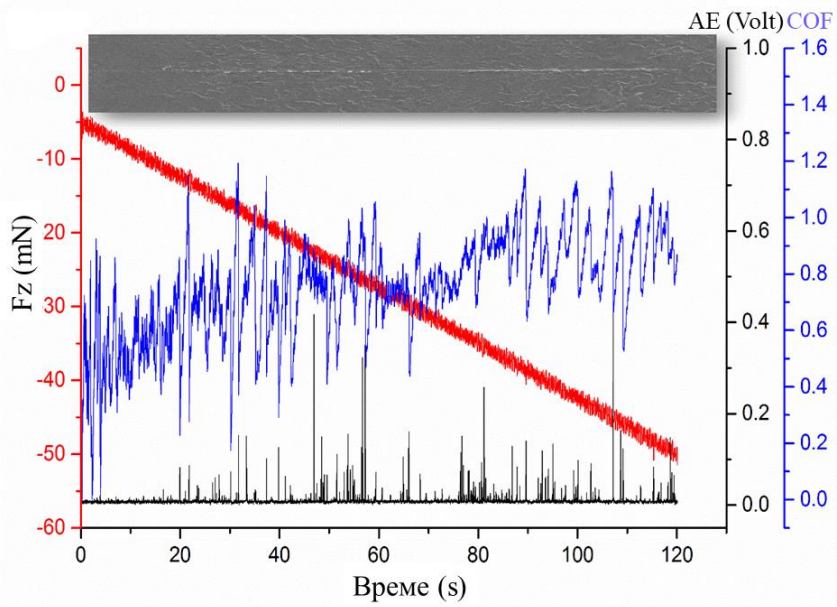
Фиг. 27: 3D топология на покритията получени чрез AFM: а) немодифицирана подложка от SS; б) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер; в) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH наногел; г) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин **3**

Установено е, че използваната подложка от неръждаема стомана е много грапава с R_a - 347 nm, с най-големи разхождения между две измервани точки, и както вече беше показано грапавостта намалява с отлагането на всеки отложен слой (R_a - 342 nm за първия слой от P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) и R_a – 302 nm за втория слой от Pox(mDOPA)/PAH

наногел). Последният фотоактивен слой на основата на 9-аминоакредин **3** е с измерена грапавост от 284 nm. Намаляване на грапавостта с всеки отложен слой, потвърждава отново наблюденията, че те се отлагат следвайки морфологията на образеца.

2.2.4. Определяне на устойчивост на надраскване на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин 3

За оценка на силата на адхезия на системата покрития-подложка отново е използван тестът за устойчивост на надраскване върху крайните фотоактивни полимерни покрития. Изпитването на устойчивостта на надраскване е проведено върху подложка от неръждаема стомана с последователно отложени три P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин **3** слоя, прилагайки постепенно нарастващо напрежение от 5 до 50 mN. Фигура 28 показва обхвата на средното натоварване (N), при който покритието се е повредило по време на изпитването на надраскване.

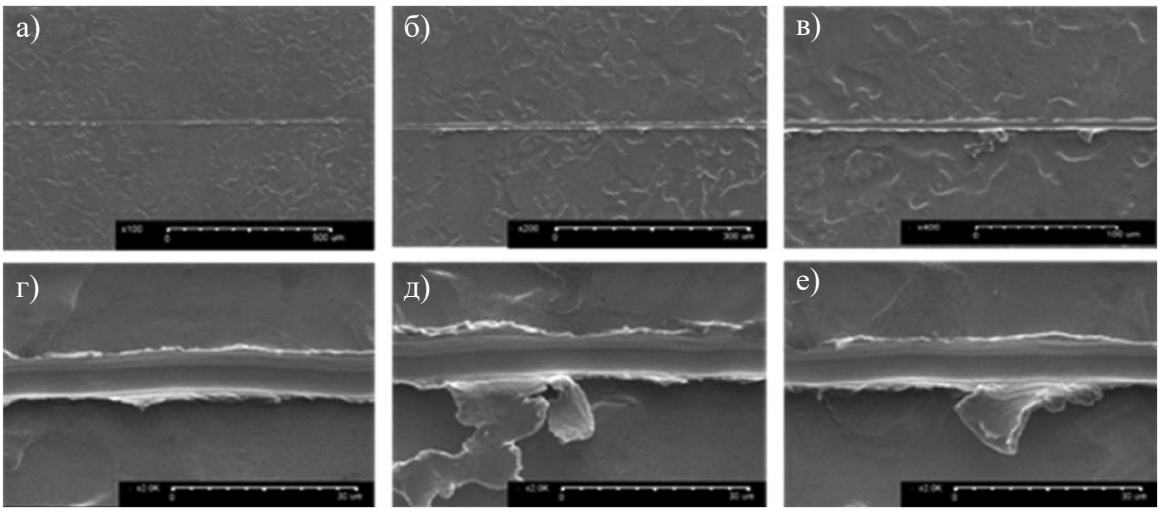


Фиг. 28: Тест за устойчивост на надраскване на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин **3** полимерно покритие. Fz – нормално натоварване (mN), AE – акустична емисия (Volt) и COF – коефициент на триене; SEM изображение на съответната драскотина.

Процесът на надраскване е проследен чрез промяната на емисията на акустичния сигнал. В резултат на проведения анализ е установено, че получените покрития притежава добра адхезия при ниски натоварвания до 15mN. Нарастването на сигнала на акустичната емисия се наблюдава при натоварвания след 15 mN, което е показателно за началото на надраскването на нанесените полимерни покрития върху SS. Коефициентът на триене (COF) е относително постоянен със средна стойност от 0.75 при стандартно отклонение от

0.18, което е индикация, че полимерния филм има равномерна дебелина. (Фигура 28). Сравнително по-високите стойности на коефициентът на триене спрямо тези получени при тестване на системата наногел-подложка, показват, че получените крайни фотоактивни полимерни покрития, притежават по-добра адхезия и степен на износване.

Проведените SEM анализи на получените драскотини в резултат на извършените изпитания на устойчивост на надраскване (Фигура 29) показват линейно нарастваща драскотина върху фотоактивните полимерни наногелни покрития, образувани върху SS подложка при натоварване от 5 до 50 mN (Фигура 29 а-в). Както се вижда, отново не се наблюдава напукване или разслояване на покритията по време на надраскването. Увеличаването на нормалното натоварване от 15 mN на 50 mN води до леко разширение на драскотината с образуване на малко количество отломки по страните на коловоза (Фигура 29 г-е). Относително малкото количество отломки от надраскването и липсата на отлепване на филма предполага добра устойчивост на надраскване и адхезия на покритията върху SS.



Фиг. 29: SEM изображения на фотоактивно полимерното покритие след провеждане на теста за устойчивост на надраскване.

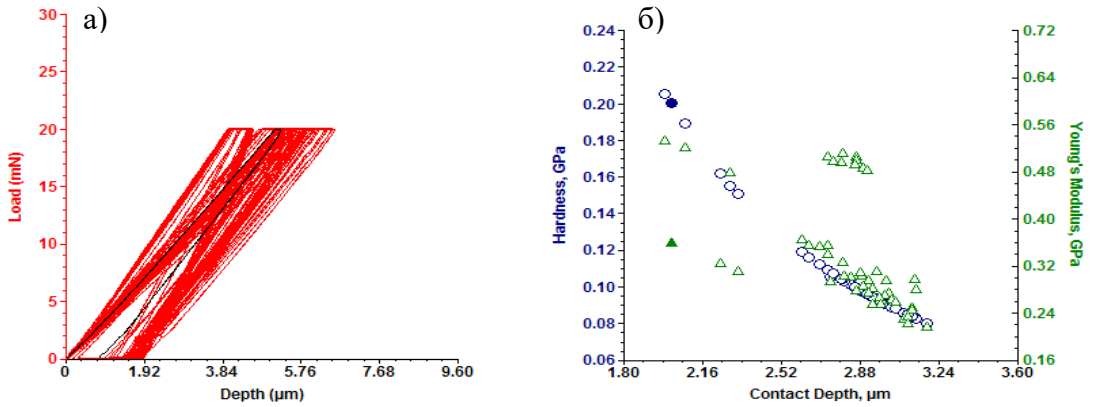
2.2.5. Наномеханичен анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин 3

Наноиндентацията се основава на теориите на контактната механика. Тестът предоставя информация за модула на еластичност, твърдостта, деформационното втвърдяване, напукването, фазовите трансформации, пълзенето и абсорбцията на енергия [15]. Тази техника се използва широко за оценка на механичните свойства на тънки филми, покрития и други наноматериали.

Ето защо механичните свойства на получените фотоактивните полимерни покрития, нанесени върху SS подложка са тествани чрез наноиндентация, използвайки Беркович

индентор при максимално натоварване от 20 mN (Фигура 30). Получените криви на натоварване-разтоварване при максимално натоварване от 20 mN, от 48 наноидентации на фотоактивните полимерни покрития върху SS, са представени на фигура 30а. За изчисляване на експерименталните резултати от наномеханичните изпитвания като твърдост и модул на еластичност се използва моделът на Olive Pharr [16].

Сравнително тесния хистерезиз получен от кривите на натоварване и разтоварване са показателни за сравнително равномерна дебелина на покритията върху подложката. В резултат на наноиндентацията е определен максималния Модул на Юнг от 0.6 GPa и твърдост от 0.21 GPa, които са показателни за добрите механични свойства на получените полимерни покрития върху SS.



Фиг. 30: а) Криви на натоварване – разтоварване от 48 наноидентации б) Твърдост и модул на еластичност като функция от дълбочината на контакта на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/Pox(mDOPA)/PAH/9-аминоакредин **3** полимерно покритие върху подложка от SS.

Намаляването на тези стойности с увеличаване на дълбочината на проникване на индентора (Фигура 30б) може да бъде свързано с линейната високоеластичност на полимерния филм, което в дълбочина е причината за по-бавната релаксация на приложеното нормално напрежение.

2.2.6. Изследване на антибактериалните свойства на модифицираните с 9-аминоакридин 3 полимерни покрития

Антибактериалната активност на модифицираните с 9-аминоакридин **3** полимерни покрития е определена срещу Грам-отрицателен щам на *E. coli*. Извършените тестове за антибактериална фотоактивност на така получените фотоактивни полимерни покрития върху SS са определени чрез метода на броене на живи клетки при осветяване използвайки 200 W източник на светлина (дължина на вълната от 380 nm до 750 nm).

Резултатите показват, че след 2 часа на контакт, скоростта на редукция е 87.4 %, а след 18 часа, скоростта на редукция е 100%, което е показателно за изявената антибактериална активност на получените фотоактивни покрития (Таблица 3).

Проведени са и антибактериални тестове и при отсъствие на осветяване с източник на светлина. Получените резултати показват, по-слабо изявена антибактериална активност при първия и втори час на контакт в сравнение с осветените проби. Независимо от това след 18-я час на контакт, скорост на редукция отново е 100% (Таблица 3).

Таблица 3: Антибактериална активност на фотоактивни полимерни покрития върху SS срещу *E. coli* (T_0 = 7.1.10^5 CFU.ml^{-1}; T_0 – първоначалния брой на бактерии в mL, използвани за теста)

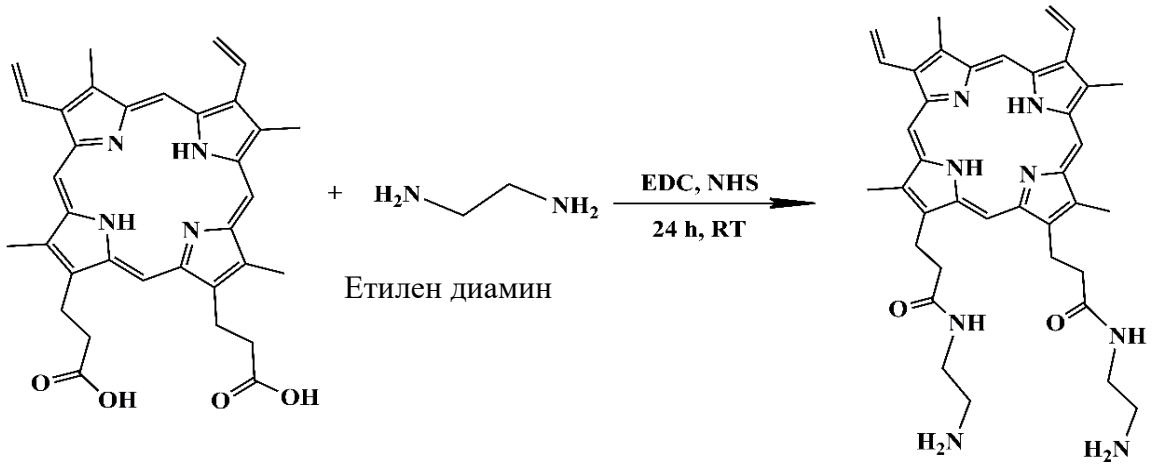
Проба	1 час на контакт		2 часа на контакт		18 часа на контакт	
	Оцелели клетки, CFU.ml^{-1}	Скорост на редукция, %	Оцелели клетки, CFU.ml^{-1}	Скорост на редукция, %	Оцелели клетки, CFU.ml^{-1}	Скорост на редукция, %
Фотоактивно полимерно покритие върху SS с осветяване	5.1x10^5	28.2	8.9x10^4	87.4	0	100
Фотоактивно полимерно покритие върху SS без осветяване	6.25x10^5	12.0	3.3x10^5	53.5	0	100

Получените резултати предполагат, че антибактериалната активност на покритията е резултат от комбиниран ефект от фотодинамичната активност на фотосенсибилизатора и неговата антибактериална активност, което се дължи на алтернативен механизъм на действие.

3. Получаване на фотоактивно полимерно покритие на основата на протопорфирин IX

3.1. Синтез на етилендиамино производно на протопорфирин IX (PPIX-ED)

Протопорфирин IX (PPIX) е фотосенсибилизатор, който е широко използван като антибактериално средство, тъй като се отличава с висока фотоактивност и същевременно притежава силна антибактериална активност поради получаването на реактивни кислородни видове, когато е изложен на видима светлина [17,18,19,20]. За да се проведе успешно ковалентното присъединяване на фотосенсибилизатора към втория полимерен слой на основата на Pox(mDOPA)/PAH е проведена химическа модификация на PPIX с оглед създаването на амино групи в структурата, които чрез подходящи амин/хинонови реакции ще доведат до получаването на крайното покритие. Това е постигнато чрез използване на излишък от етилен диамин в присъствието на 1-(3-диметиламино-пропил)-3-етил карбодимид (EDC) и N-хидрокси сукцинимид (NHS) съгласно схема 7.



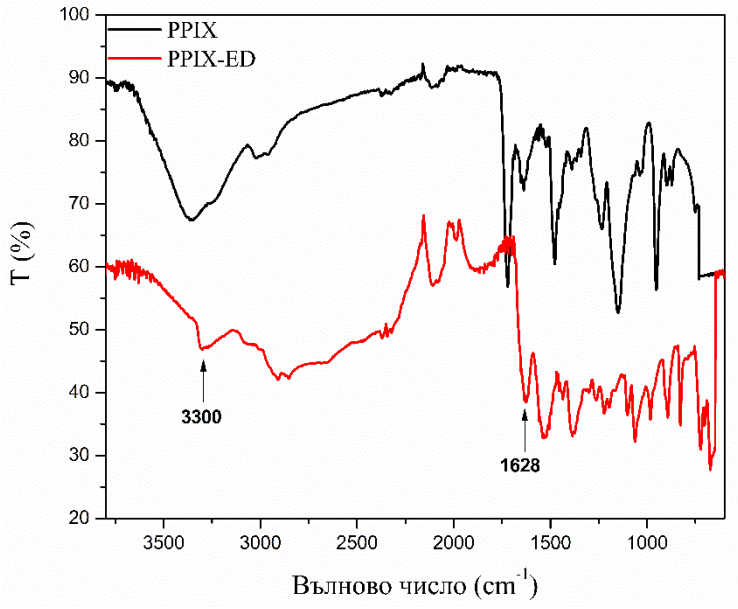
PPIX PPIX-ED

Схема 7: Получаване на етилен диамино производно на протопорфирин IX (PPIX-ED)

За доказване на проведената модификация и получаването на амино модифициран протопорфирин е използвана твърдофазна инфрачервена спектроскопия (ATR-FTIR), протонен ядрено магнитен резонанс (^{1}H NMR), UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия.

3.1.1. ATR-FTIR анализ на амино модифициран протопорфирин IX (PPIX-ED)

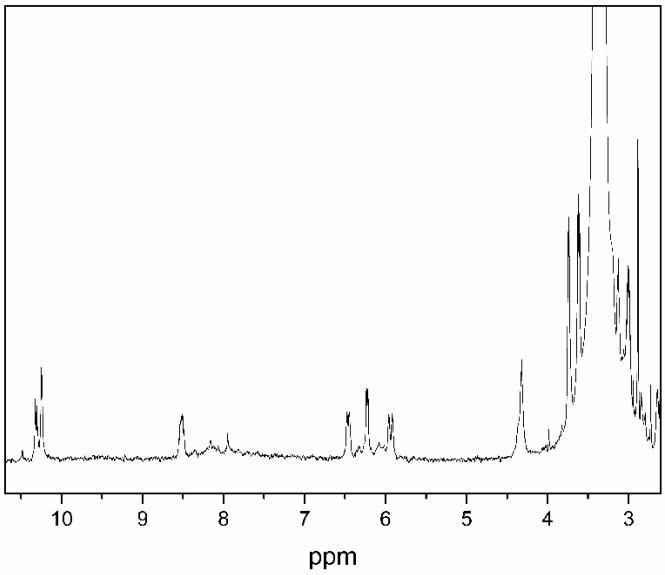
ATR-FTIR спектърът (Фигура 31) доказва успешната модификация и получаването на амино модифициран протопорфирин чрез появата на всички характерни пикове при 3300 cm^{-1} за N–H вибрациите, при 2911 cm^{-1} за асиметричните вибрации на $–CH_2–$; при 2855 cm^{-1} за симетричните вибрации на $–CH_2–$ групите; при 1628 cm^{-1} произтичащи от –CONH– групите (Amide I band) и при 1533 cm^{-1} за νC=O от CONH– групите (Amide II band).



Фиг. 31: ATR-FTIR спектър на амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED)

3.1.2. ^{1}H NMR анализ на амино модифициран протопорфирин IX (PPIX-ED)

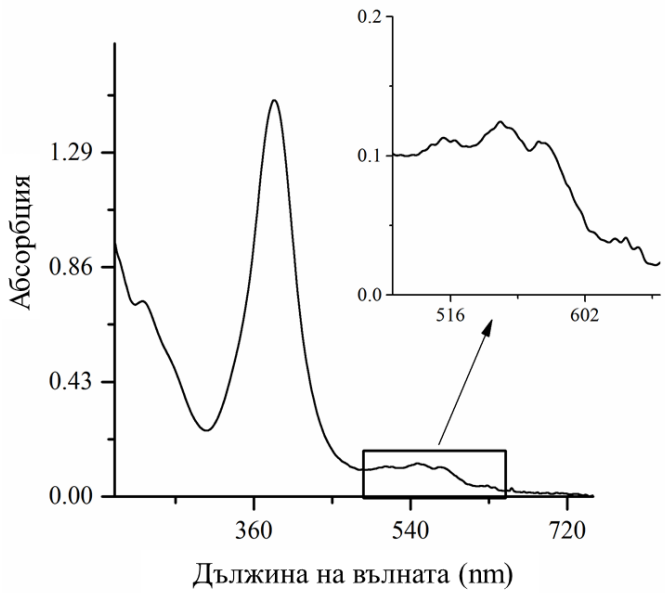
^{1}H NMR спектърът (Фигура 32) на амино модифицирания PPIX също потвърждава резултатите получени от ATR-FTIR спектроскопията чрез появата на всички характерни сигнали при 10.25 ppm (4H, =CH–), 8.5 ppm (2H, –CH=CH_2), 6.23 ppm (4H, –CH=CH_2), 5.96 ppm (2H, -CO-NH–), 4.32 ppm (4H, –CH_2–CH_2-CO-), 3.62 ppm (4H, –NH–CH_2–CH_2-NH_2), 3.36 ppm (13H, CH_3), 3.13 ppm (4H, –CH_2 –CH_2 -CO -), 2.88 ppm (4H,–NH–CH_2–CH_2-NH_2).



Фиг. 32: ^{1}H NMR спектър на PPIX-ED

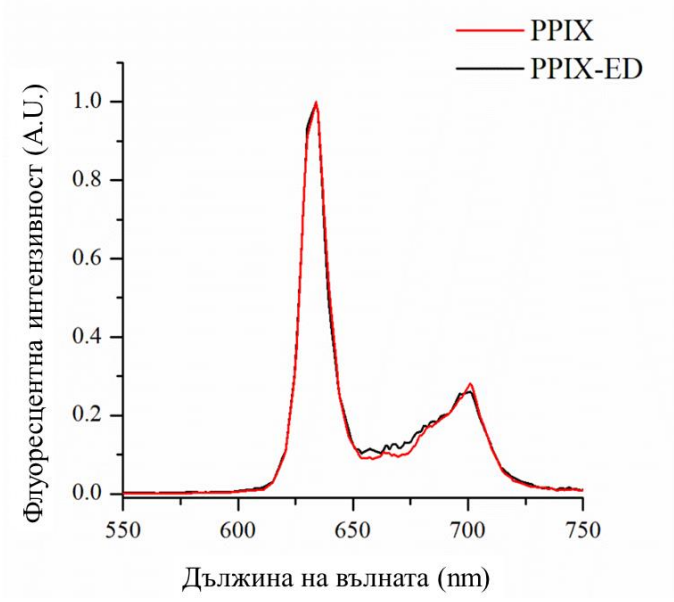
3.1.3. Флуоресцентен анализ на полученото етилен диамино производно на протопорфирин IX

Абсорбционният спектър ясно илюстрира наличието на порфиринова архитектура, която представлява сбор от два абсорбционни пика. Първият е центриран при 380 nm, което е характерно за протопорфирин IX Soret ивица. Вторият пик на абсорбция се появява в диапазона между 450 nm и 650 nm и показва три добре изразени максимума при 510 nm, 548 nm и 574 nm, което е типично за абсорбция на порфириновите Q ивици (Фигура 33).



Фиг. 33: Абсорбционен спектър на амино модифициран протопорфирин

Проведеният флуоресцентен анализ показва също, че въвеждането на етилен диамин в структурата на протопорфирина не влияе на спрегната флуорофорна система и двете съединения показват еднакъв флуоресцентен спектър (Фигура 34).



Фиг. 34: Флуоресцентен анализ на немодифициран PPIX и на амино модифициран PPIX-ED.

3.1.4. Антибактериална активност на полученото етилен диамино производно на протопорфирин IX

Антибактериалната активност на получения амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED) е определена спрямо Грам-отрицателните *E. Coli* и спрямо Грам-положителните *B. Subtilis* щамове при осветяване (дължина на вълната от 380 nm до 750 nm) използвайки дисково-дифузионен метод (DDM). Полученият PPIX-ED показва силна антибактериална активност, чрез поява на зона на потискане от 9 до 12 mm в зависимост от използвания щам (Таблица 4). По-силна антибактериална активност е определена спрямо Грам отрицателния *E. Coli* в сравнение с Грам-положителния *B. Subtilis*. Известно е, че Грам-положителните и Грам-отрицателните бактерии имат разлики в структурата на мембраната си, като една от най-характерните е дебелината на пептидогликановия слой [21]. Следователно, по-високата антибактериална ефикасност срещу E. coli може да произтича от разликата в тяхната мембранна структура.

Таблица 4: Антибактериална активност на амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED), определена чрез ДДМ

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
PPIX-ED	9.3	12.2

3.2. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED) върху подложка от неръждаема стомана (SS)

Покритията на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED) са получени използвайки вече описаната “dip coating” процедура съгласно схема 8.

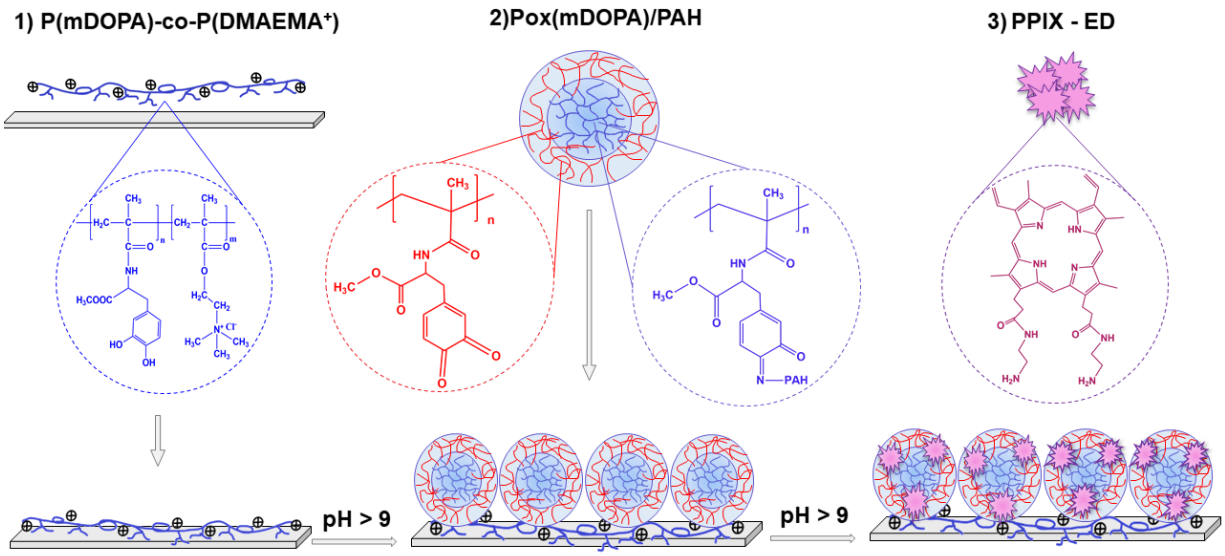
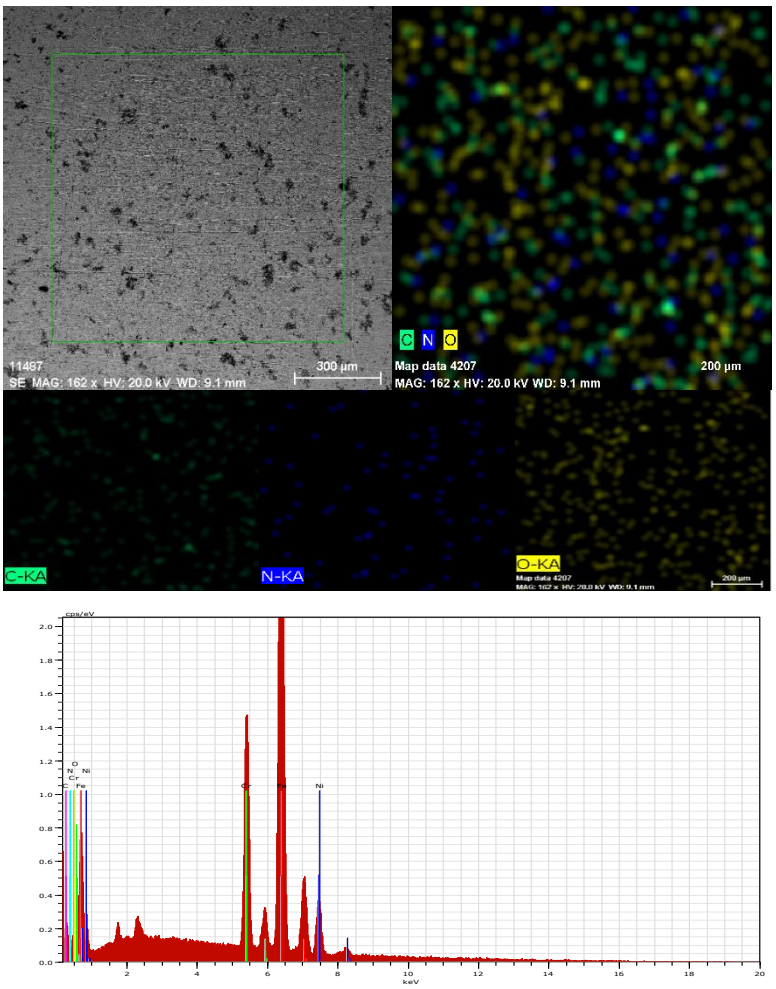


Схема 8: Стратегия за получаване на фотоактивни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и амино модифициран протопорфирин (PPIX-ED).

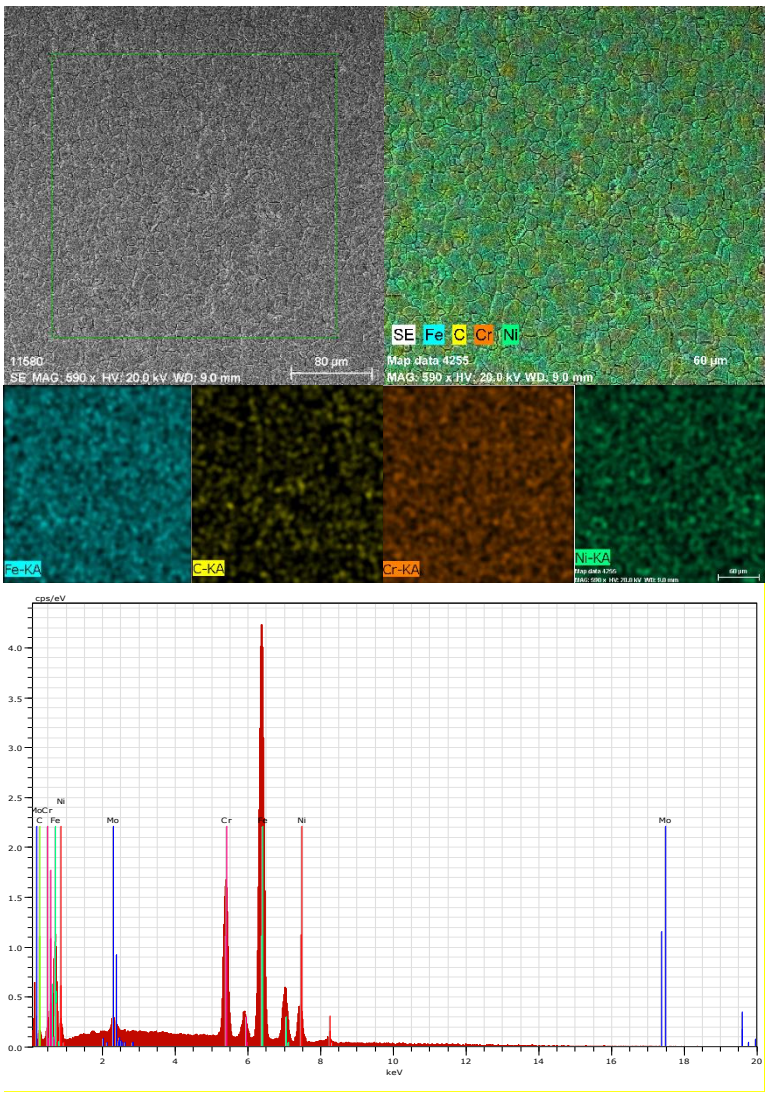
Като първи слой е използван воден разтвор на поликатионен съполимер P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (2 g/L, pH 7). Следващият слой, който изгражда покритието е воден разтвор на Pox(mDOPA)/PAH наногел (1 g/L, pH > 9). Последният слой се състои от разтвор на амино модифициран протопорфирин. Времето за отлагането на всеки слой е 15 мин. със стъпка на промиване с дейонизирана вода между тях.

3.2.1. EDX-SEM анализ на получените полимерни покрития на основана на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED

Отлагането на слоевете върху SS субстрата е определено чрез енергийно-дисперсивен рентгенов анализ и сканираща електронна микроскопия (EDX-SEM) и е направена съпоставка с чист SS субстрат (Фигура 35).



Фиг. 35: a) EDX-SEM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/ Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покритие върху SS субстрат.

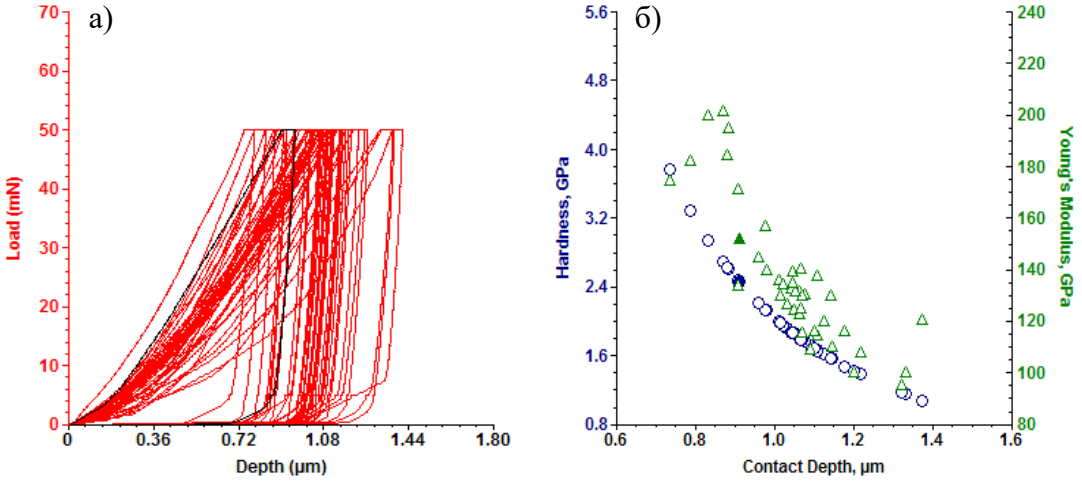


Фиг. 35: б) EDX-SEM анализ на чист SS субстрат

Получените резултати от EDX-SEM анализът на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покритията върху SS субстрат показват известно агрегиране на PPIX-ED върху субстрата и присъствие на основните елементи, които произтичат от покритието, както следва: въглерод (C-53.9 at. %), кислород (O-2.79 at.%) и азот (N-4.2 at.%) (Фигура 35а). За сравнение картографирането на чистия SS субстрат показа присъствието на всички характерни за неръждаемата стомана елементи като желязо (Fe-67.2 at.%), хром (Cr-16.08 at.%) и никел (Ni-9.15 at.%) (Фигура 35б). Тези резултати показват успешното отлагане на слоевете и получаване на покритията.

3.2.2. Наномеханичен анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED

Механичните свойства на получените P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покрития са определени чрез наноиндентация. Получените криви на натоварване-разтоварване при максимално натоварване до 50 mN, от 48 наноидентации на покритието върху SS, са представени на фигура 36а. От проведения анализ са получени следните стойности за твърдостта и модула на еластичност: 1.80 GPa и 130 GPa, съответно (Фигура 36).



Фиг. 36: а) Криви на натоварване – разтоварване от 48 наноидентации; б) твърдост и модул на еластичност като функция от дълбочината на контакта на полученото P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED полимерно покритие върху подложка от SS.

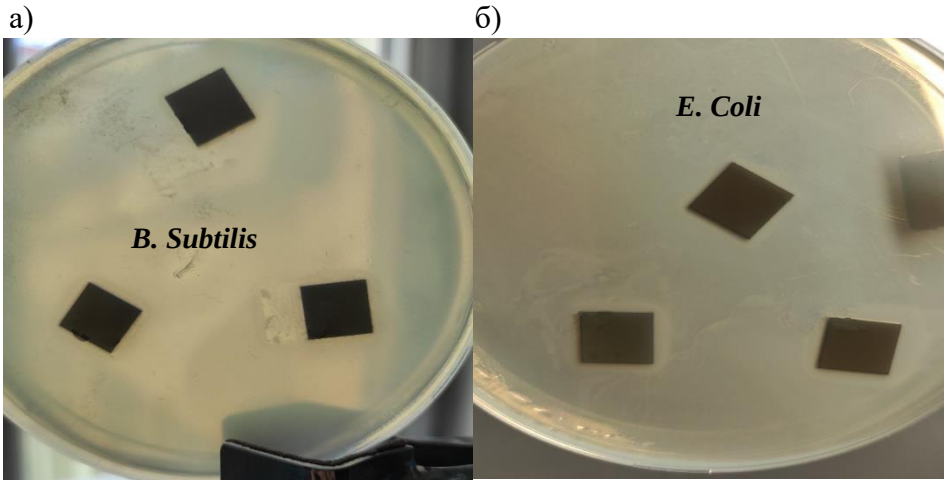
Тези резултати показват, че покритието притежава добри механични показатели, когато е нанесен третия слой, състоящ се от фотосенсибилизатор на основата на протопорфирин.

3.2.3. Антибактериална активност на получените полимерни покрития на основана на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED

Антибактериалната активност на получените P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покрития е определена срещу грам-отрицателните *E. coli* и грам положителните *B. subtilis* бактерии, при осветяване (дължина на вълната от 380 nm до 750 nm) използвайки модифициран дисково-дифузионен метод (DDM). Покритията показват силна антибактериална активност, чрез поява на зона на потискане от 12 до 16 mm в зависимост от използвания щам (Таблица 5, Фигура 37). По-силна антибактериална активност отново е установена спрямо Грам отрицателния *E. Coli* в сравнение с Грам-положителния *B. Subtilis*, което е резултат на разликите в структурата на мембраните им.

Таблица 5: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покрития върху неръждаема стомана

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED	12.6	16.5



Фиг. 37: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED срещу а) *B. subtilis* и б) *E. Coli*

4.Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел

4.1. Получаване на полимерен наногел с включени сребърни наночастици (AgNps) на основата на P(mDOPA)

Един от подходите за придаване на антибактериални свойства на материалите е използването на метални наночастици (MeNPs). Сред MeNPs, сребърните наночастици (AgNPs) притежават най-ефективна антибактериална активност, тъй като те разрушават бактериалната стена и нарушават вътреклетъчния баланс [21]. Известно е, че сребърните наночастици притежават висока бактерицидна активност срещу Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии поради сложен механизъм на действие и за бактериите е по-трудно да развият резистентност към среброто в сравнение с конвенционалните използвани средства [22]. Ето защо е синтезиран полимерен наногел с включени сребърни наночастици (AgNps) на основата на полиметакриламид съдържащ 3,4-дихидрокси-L-фенилаланинови (DOPA) групи (P(mDOPA) и полиалиламин (PAH), съдържащ първични амино групи. Това

е осъществено, като определено стехиометрично количество от P(mDOPA) е разтворено във вода, след което е добавен $AgNO_3$ в определени молни съотношения спрямо P(mDOPA). Получената суспензия е оставена за 24 часа при непрекъснато разбъркване, след което е добавен полиалиламина при pH > 9 (Схема 9).

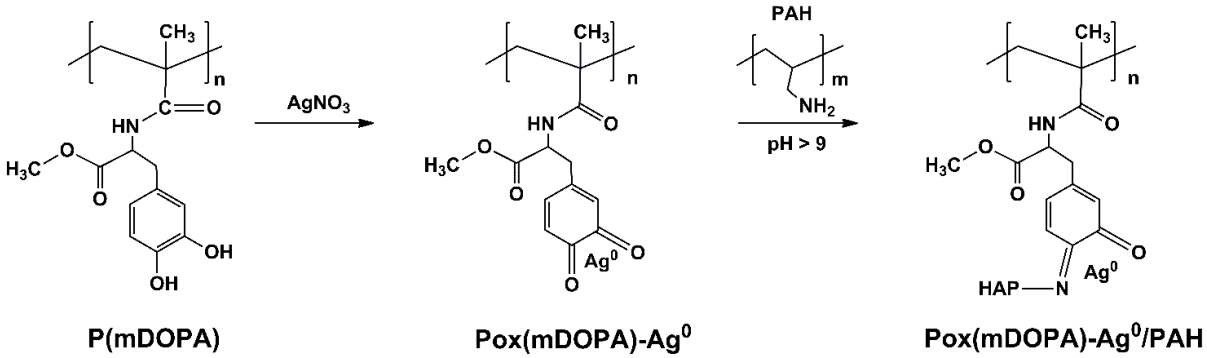
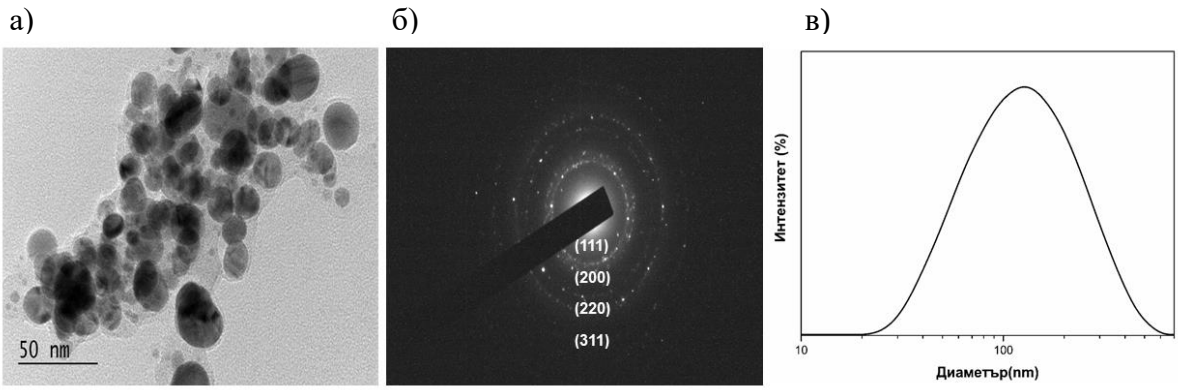


Схема 9: Стратегия за получаване на омрежен полимерен наногел с включени сребърни наночастици (Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH)

4.1.1. DLS и TEM анализ на получения (Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH) наногел

Полученият омрежен полимерен наногел с включени сребърни наночастици (Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH) е охарактеризиран с трансмисионна електронна микроскопия (TEM) и динамично светлоразсейване (DLS). TEM анализът ясно показа формирането на сребърни наночастици включени в полимерния наногел, които имат среден размер от 20-30 nm, които са склонни към агрегиране (Фигура 38а). Проведена е и електронна дифракция в селектирана област (SAED), която се използва за определяне на кристалната структура и типа вещество в дадена област от образеца. SAED анализът показа наличието на всички характерни за среброто дифракционни пръстени, които отговарят на (111), (200), (220) и (311) отражения на челно центрираната кубична решетка (fcc) на среброто и потвърждава кристалната природа на получените сребърни наночастици (Фигура 38б) [23]. Резултатите от динамичното разсейване на светлина също потвърждават получаването на добре дефиниран наногелове с включени сребърни наночастици, които имат среден хидродинамичен диаметър от 110 nm и индекс на полидисперсност от 0.2 (Фигура 38в).



Фиг. 38: а) TEM анализ на получения Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени AgNps; б) SAED анализ на Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени AgNps; в) DLS анализ на Pox(mDOPA)/PAH наногел с AgNps.

4.1.2. Антибактериална активност на получения Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел

Антибактериалната активност на получения Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени AgNps е определена спрямо Грам-отрицателните *E. Coli* и спрямо Грам-положителните *B. Subtilis* щамове чрез дисково-дифузионния метод. Полученият Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел показва силна антибактериална активност, чрез поява на зона на потискане от 9.5 до 11.2 mm в зависимост от използвания щам (Таблица 6). По-силна антибактериална активност е определена спрямо Грам отрицателния *E. Coli* в сравнение с Грам-положителния *B. Subtilis*. Известно е от литературата, че сребърните наночастици имат по-силна бактерицидна активност спрямо Грам отрицателните бактерии, което се дължи на разликите в структурата на мембраните им [21].

Таблица 6: Антибактериална активност на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH	9.5	11.2

4.2. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел върху подложка от неръждаема стомана (SS)

Полученият полимерен наногел с включени сребърни наночастици е използван за получаването на полимерно покритие върху подложка от неръждаема стомана. За постигане на това е използвана описаната “dip 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 последващо в

Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH (1 g/L, pH 9) воден разтвор на наногела с включени сребърни наночастици за определен период от време (Схема 10), което беше установено чрез кварцово кристална микровезна, че подходящото време за отлагането на слоевете е 15 мин., със стъпка на промиване с дейонизирана вода между двете отлагания.

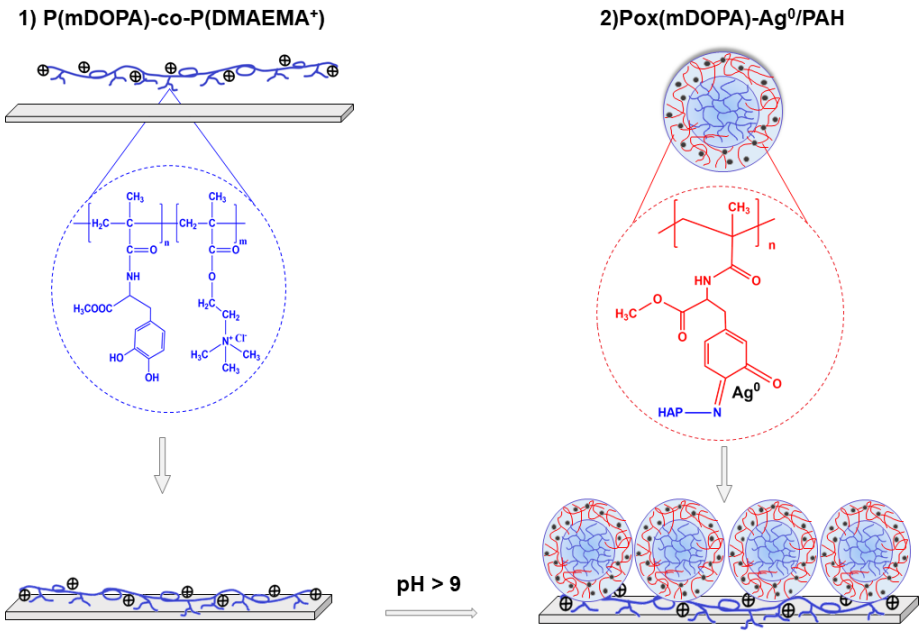
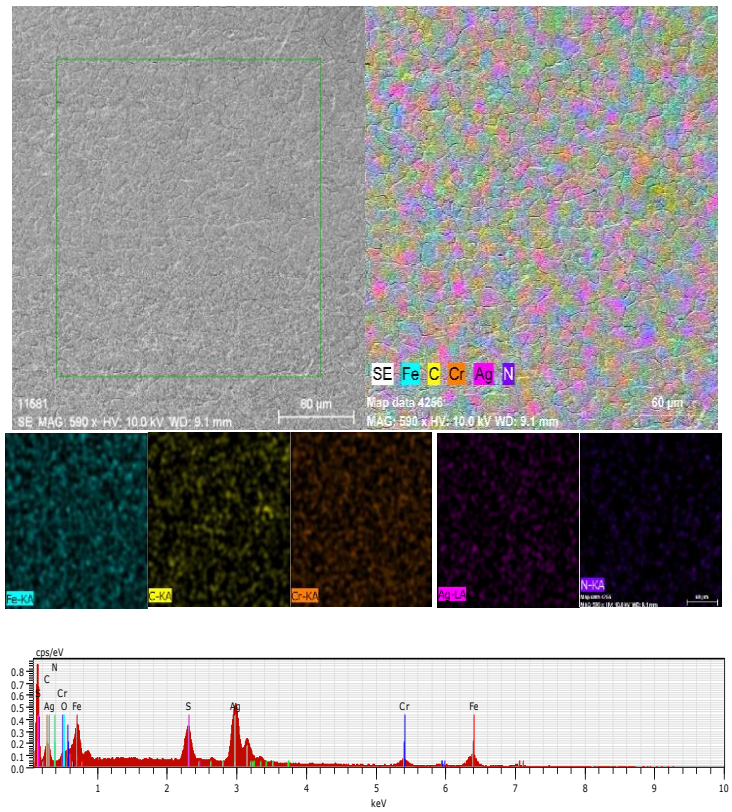


Схема 10: Получаване на покритие на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел със сребърни наночастици.

4.2.1. EDX-SEM анализ на получените полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел

Отлагането на слоевете върху SS субстрата е определено чрез енергийно-дисперсивен рентгенов анализ и сканираща електронна микроскопия (EDX-SEM). Установено е равномерно разпределение на сребро върху субстрата, както и наличието на въглерод, кислород и азот, които произтичат от Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногела (Фигура 39).

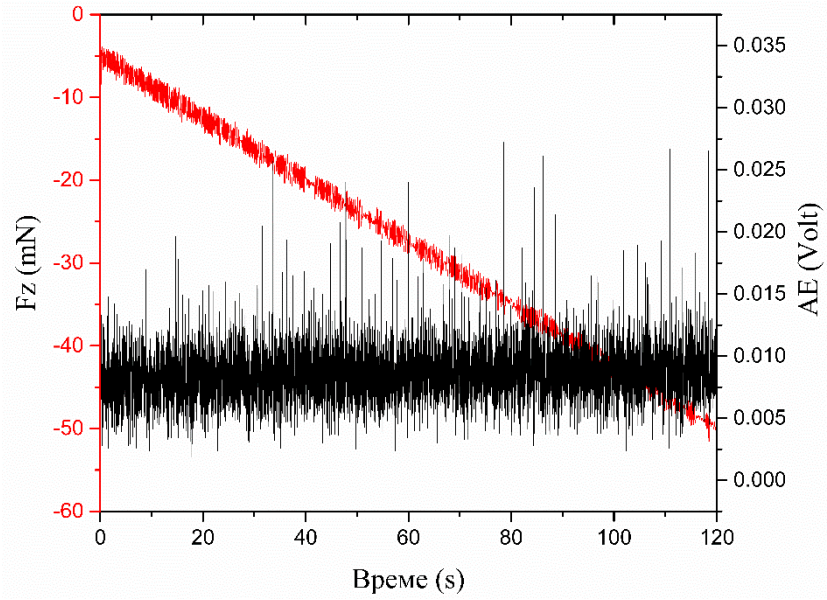


Фиг. 39: EDX-SEM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покритието върху SS субстрат.

Тези резултати показват успешното отлагане на слоевете и получаване на покритията на основата на Pox(mDOPA)-Ag0/PAH наногел.

4.2.2. Определяне на устойчивост на надрасквane на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH

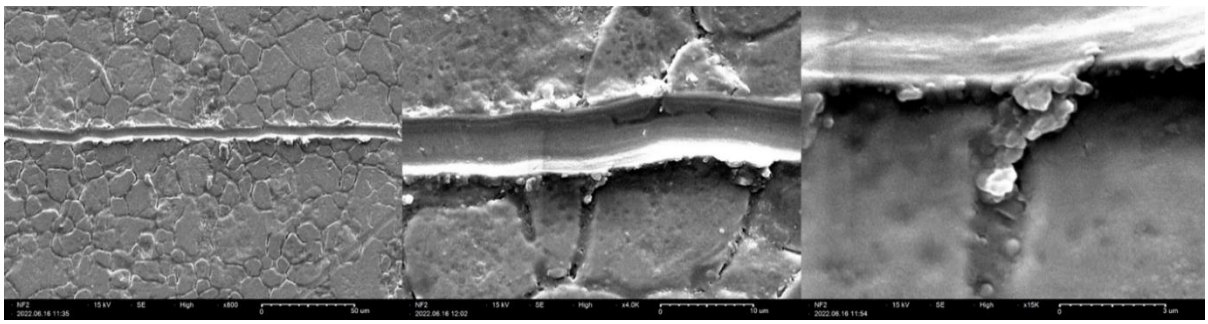
Тестът за устойчивост на надрасквane на покритието на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH е проведен, използвайки UMT (Bruker) модул за изпитване на надрасквane с диамантен сферично-коничен връх с радиус на върха (DSH-025, R = 2,5 μm) на разстояние от надрасквane 5 mm със скорост на надрасквane 0,083 mm/s с постепенно увеличаване на натоварването от 5 до 50 mN. Фигура 40а представя натоварването, при което покритието се нарушава по време на процеса на надрасквane, което е проследено чрез промяна в сигнала на акустичната емисия.



Фиг. 40: а) Тест за устойчивост на надраскване на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/ Pox(mDOPA)-Ag^{0}/PAH покритие. Fz – нормално натоварване (mN), AE – акустична емисия (Volt).

В резултат на проведения анализ е установено, че получените покрития притежава добра адхезия при натоварвания до 20 mN. Нарастването на сигнала на акустичната емисия се наблюдава при натоварвания след 20 mN, което е показателно за началото на надраскването на нанесените полимерни покрития върху SS. Коефициентът на триене (COF) е относително постоянен със средна стойност от 0.53 при стандартно отклонение от 0.2, което е индикация, че полимерния филм има равномерна дебелина.

Проведеният SEM анализ на получените драскотини показва линейно нарастваща драскотина на полимерните покрития, отложени върху SS подложка, което е в съгласие с наблюдаваните промени в сигнала на акустичната емисия (Фигура 40б). Относително малкото количество отломки получени от изпитанието за устойчивост на надраскване и липсата на отлепване или напукване на покритието при непрекъснато нарастващо натоварване от 5 до 50 mN предполага добра устойчивост на надраскване и адхезивна здравина на покритията върху използваната подложка от SS.

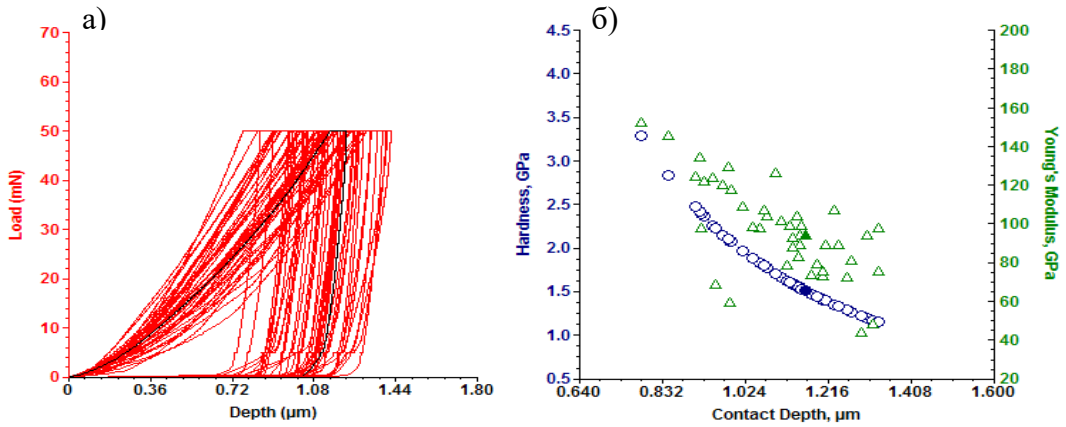


Фиг. 40: б) SEM анализ на драскотина на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покритие.

4.2.3. Наномеханичен анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH

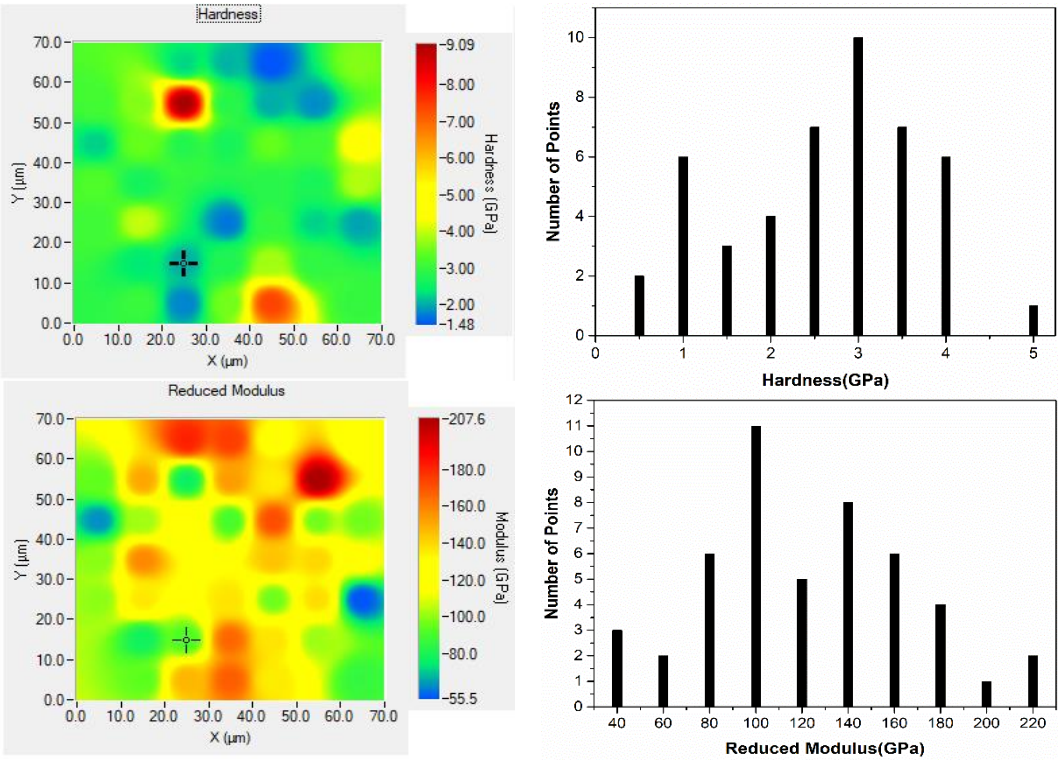
Механичните свойства на получените полимерни покрития с включени сребърни наночастици, нанесени върху SS подложка са тествани чрез наноиндентация, използвайки Беркович индентор при максимално натоварване до 50 mN (Фигура 41).

Получените криви на натоварване-разтоварване при максимално натоварване до 50 mN, от 48 наноидентации на покритието върху SS, са представени на фигура 41а. За изчисляване на експерименталните резултати от наномеханичните изпитвания като твърдост и модул на еластичност се използва моделът на Olive Pharr [16,24]. От проведения анализ на получените покрития са получени следните стойности за твърдостта и модула на еластичност: 1.76 GPa и 96.76 GPa, съответно. Тези резултати показват, че покритието притежава добри механични свойства.



Фиг. 41: а) Криви на натоварване – разтоварване от 48 наноидентации б) Твърдост и модул на еластичност като функция от дълбочината на контакта на полученото P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH полимерно покритие с включени сребърни наночастици върху подложка от SS.

Последващо е проведено висикоскоростно, количествено (нано)механично картографиране (accelerated property mapping–XPM). Този метод се състои в бързо наноиндентиране с висока разделителна способност, чрез което се получават количествени карти на наномеханични свойства и разпределения на свойствата за много кратко време в сравнение със стандартните режими [25]. От получените резултати и хистограмите се вижда сравнително тясно разпределение на наномеханичните параметри като твърдост и модула на еластичност на покритието, което е индикация за хомогенността на повърхността на покритието (Фигура 42).



Фиг. 42: XPM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покритие.

4.2.4. Антибактериална активност на получените полимерни покрития на основана на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH

Антибактериалната активност на получените P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покрития е определена срещу грам-отрицателните *E. coli* и грам положителните *B. subtilis* бактерии, при осветяване (дължина на вълната от 380 nm до 750 nm) използвайки модифициран дисково дифузионен метод (DDM). Покритията показват силна антибактериална активност, чрез поява на зона на потискане от 13.1 до 15.0 mm в зависимост от използвания щам (Таблица 7). По-силна антибактериална активност е установена спрямо Грам отрицателния *E. Coli* в сравнение с Грам-положителния *B. Subtilis*.

По-високата антибактериална ефективност срещу *E. coli* може да произтича от разликата в тяхната мембранна структура.

Таблица 7: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покрития върху неръждаема стомана

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
P(mDOPA)-co- P(DMAEMA$^+$) / Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH	13.1	15.0

5. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и PPIX-ED фотосенсибилизатор върху подложка от неръждаема стомана (SS)

Функционализирането на получените покрития на основата на наногелове със сребърни наночастици е проведено с амино модифицирания фотосенсибилизатор на основата на протопорфирин IX. За тази цел, използвайки отново описана „dip coating" процедура, са получени покрития (Схема 11), при които като първи слой е използван отново воден разтвор на поликатионен съполимер P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$). Следващият слой е воден разтвор на Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици, а последният слой се състои от PPIX-ED фотосенсибилизатора (Схема 11). Времето за отлагането на всеки слой е 15 мин. със стъпка на промиване с дейонизирана вода между тях.

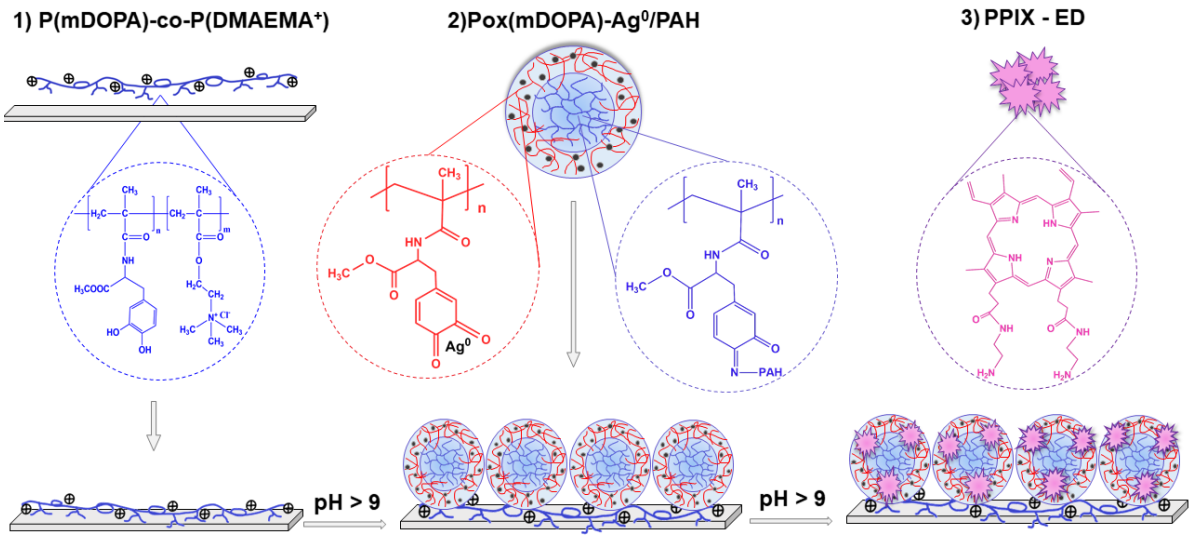
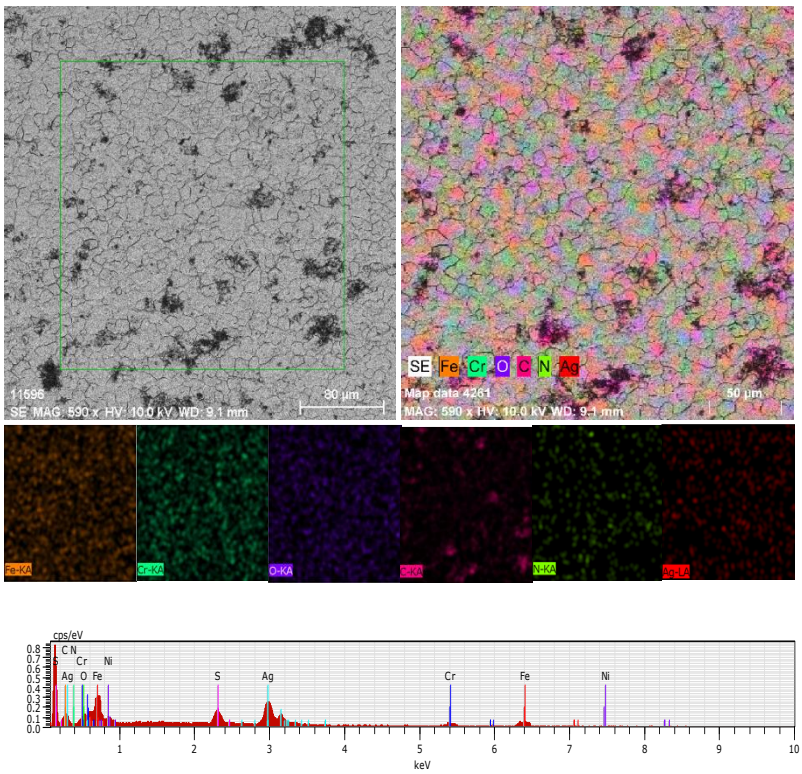


Схема 11: Стратегия за получаване на фотоактивни полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел и PPIX-ED.

Повърхностните и механични свойства на получените покрития са изследвани с помощта на EDX-SEM, микротест за устойчивост на надраскване и сканиращата електронна микроскопия, наноиндентация и висикоскоростна наноиндентация (XPM).

5.1. EDX-SEM анализ на получените полимерни покрития на основана на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED

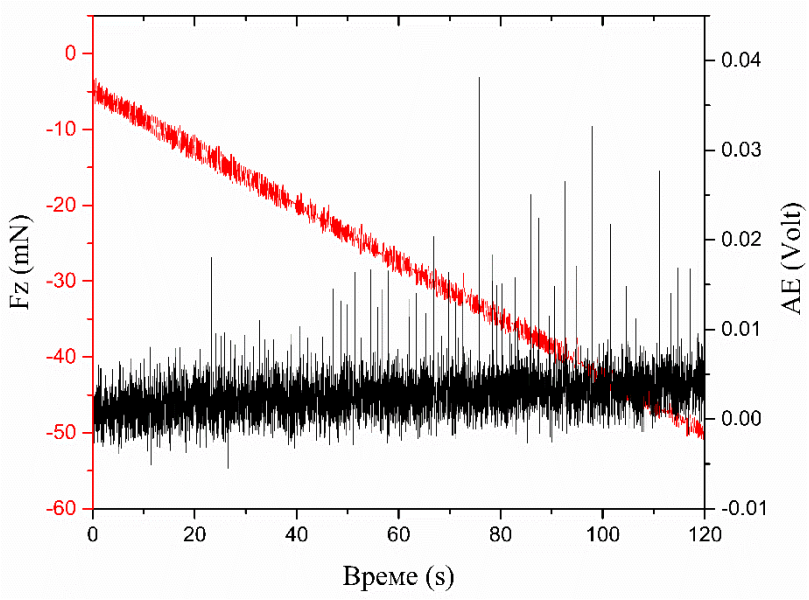
EDX-SEM анализът на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покритие показа отново наличието на въглерод (C), кислород (O) и азот (N). Присъствието на сребро обаче не е така силно изразено. Забелязва се и известно агрегиране на PPIX-ED върху субстрата, където съдържанието на въглерод е по-високо - 64 at.%, в сравнение с други области на покритието, където съдържанието на въглерод е 57 at.% (Фигура 43).



Фиг. 43: EDX-SEM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покритие върху SS субстрат.

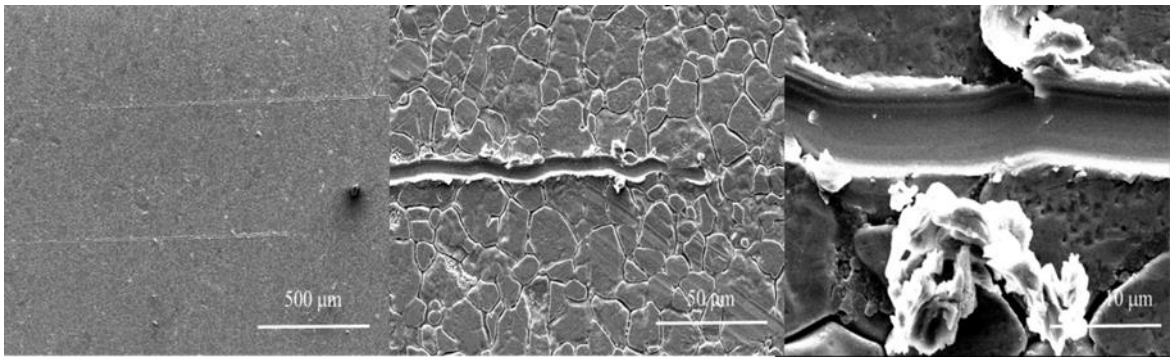
5.2. Определяне на устойчивост на надраскване на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED

За оценка на адхезията на полученото P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH/PPIX-ED покритие е проведен тест за микронадраскване (Фигура 44). Забелязва се нарастване на акустичния сигнал дори при по-високо натоварване от 30 mN с коефициент на триене (COF) от 0.5 (Фигура 44а). Коефициентът на триене слабо намалява след отлагането на крайния PPIX-ED слой, което е показателно за по-висока устойчивост на надраскване и по-добра адхезия на покритието към SS субстрата спрямо P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH покритието.



Фиг. 44: а)Тест за устойчивост на надраскване на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/ Pox(mDOPA)-Ag^{0}/PAH /PPIX-ED покритие. Fz – нормално натоварване (mN), AE – акустична емисия (Volt).

SEM изображенията на получените драскотини получени при непрекъснато нарастващо натоварване от 5 до 50 mN по време на теста, показват отново линейно нарастваща драскотина без наличието на напукване или отлепване на покритието, а само малко количество отломки в резултат на надраскването на покритието (Фигура 44б). Тези резултати предполагат добра устойчивост на надраскване и адхезивна здравина на покритията върху използваната подложка от SS.

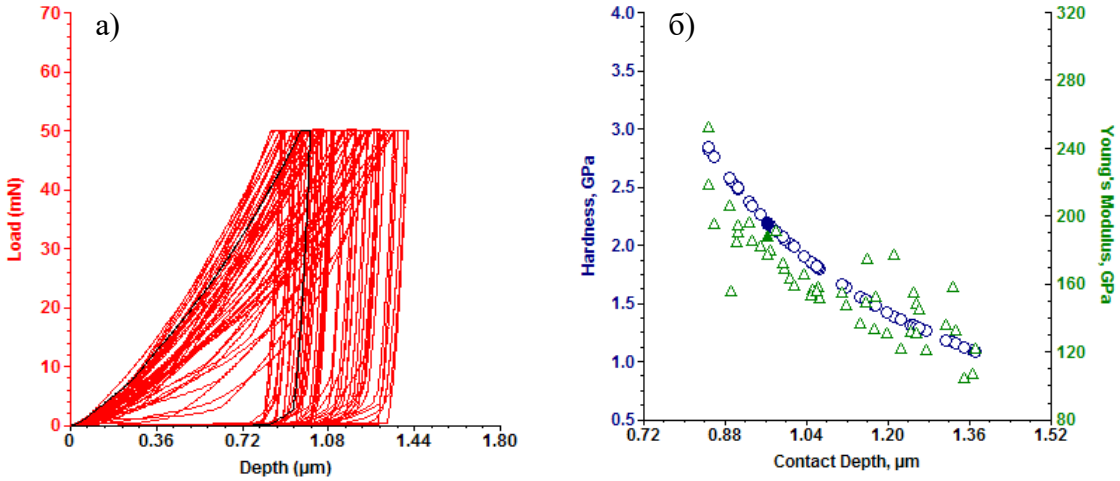


Фиг. 44: б) SEM изображения на драскотина на покритието.

5.3. Наномеханичен анализ на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/Pox(mDOPA)-Ag^{0}/PAH /PPIX-ED

Механичните свойства на получените крайни полимерни покрития нанесени върху SS подложка са тествани чрез наноиндентация, използвайки Беркович индентор при максимално натоварване до 50 mN. Получените криви на натоварване-разтоварване при

максимално натоварване до 50 mN, от 48 наноидентации на фотоактивните полимерни покрития върху SS, са представени на фигура 45а. От проведения анализ са получени следните стойности за твърдостта и модула на еластичност: 1.82 GPa и 160.9 GPa, съответно на получените покрития.



Фиг. 45: а) Криви на натоварване – разтоварване от 48 наноидентации; б) твърдост и модул на еластичност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покритието.

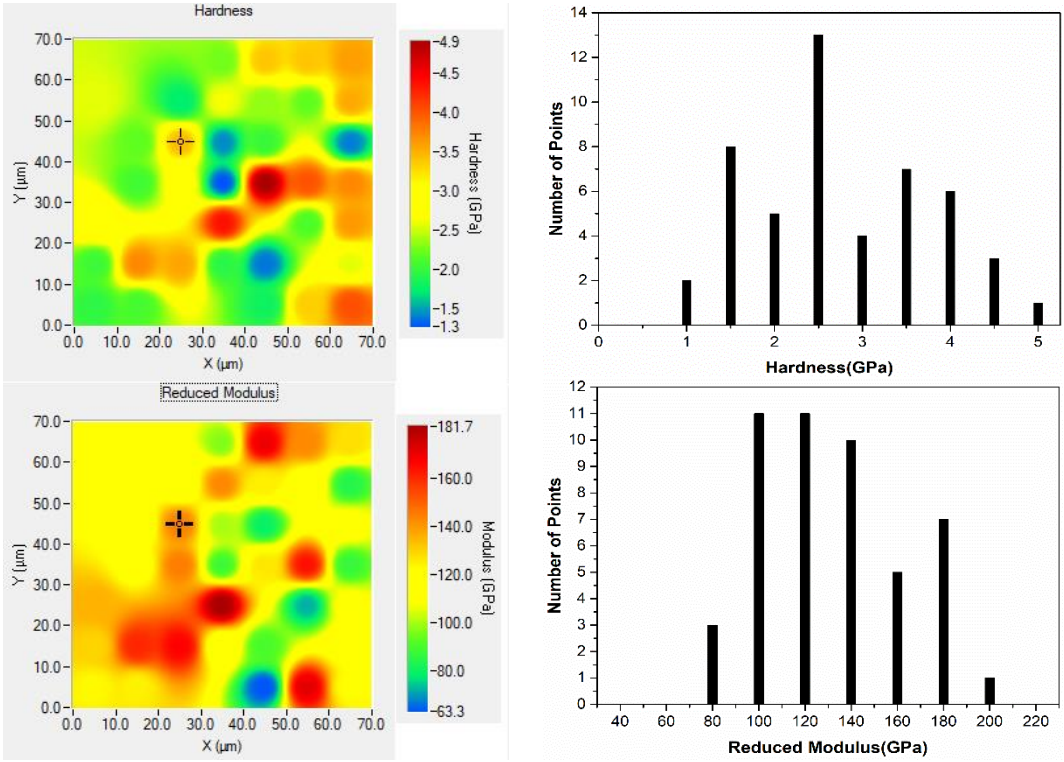
Данните от проведената наноиндентация показват, че покритията, състоящи се от Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и последен слой състоящ се от амино модифицирания протопорфирин притежават най-добри адхезивни и механични показатели (Таблица 8).

Таблица 8. Механични показатели на получените покрития

Покритие	**Твърдост H (GPa)**	**Модул на еластичност E (GPa)**
P(mDOPA)-co- P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH	1.76	96.8
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED	1.80	130
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED	1.82	160.9

Последващо е проведено висикоскоростно, количествено (нано)механично картографиране (XPM). Проведеният XPM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH/PPIX-ED покритието показва сравнително хомогенна повърхност.

Забелязва се по-широко разпределение на твърдостта и модула на еластичност, което може да се обясни с набюдаваното агрегиране на PPIX-ED върху субстрата (Фигура 46).



Фиг. 46: XPM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покритие

5.4. Антибактериална активност на получените полимерни покрития на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED

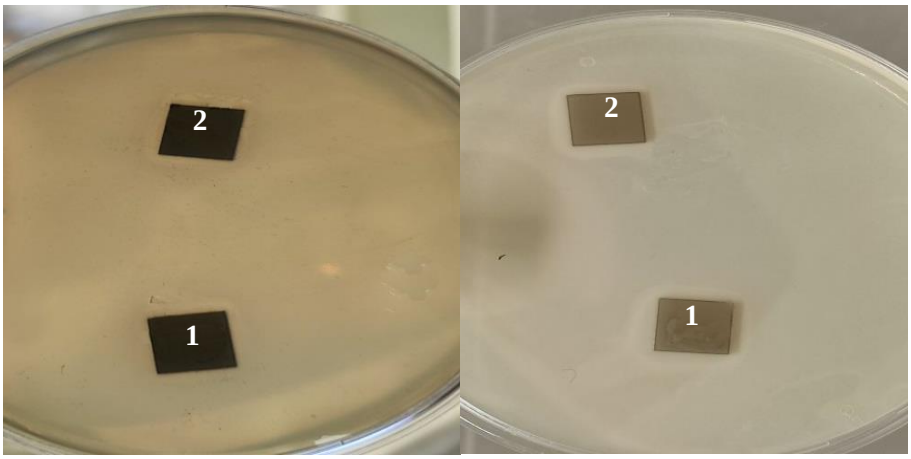
Антибактериалната активност на получените P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/ Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покрития е определена срещу грам-отрицателните *E. coli* и грам положителните *B. subtilis* бактерии, при осветяване (дължина на вълната от 380 nm до 750 nm) използвайки модифицирания дисково-дифузионен метод (DDM). Покритията показват силна антибактериална активност чрез поява на зона на потискане от 14.0 до 17.4 mm в зависимост от използвания щам (Таблица 9, Фигура 47). По-силна антибактериална активност отново е установена спрямо Грам отрицателния *E. Coli* в сравнение с Грам-положителния *B. Subtilis*, поради разлики в структурата на мембраната им.

Направена е съпоставка между антибактериалната активност между полимерните покритията на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел и получените полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH наногел и фотосенсибилизатор PPIX-ED (Фигура 47). По-висока антибактериална активност независимо от използваните щамове се наблюдава при фотоактивното антибактериално покритие, което се състои от Pox(mDOPA)/PAH наногел с включени сребърни наночастици и амино модифиирания

протопорфирин IX. Това е резултат от наличието на синергичен ефект на сребърните наночастици и фотоактивния PPIX-ED слой, който би осигурило дълготрайна бактерицидна активност на полученото покритие (Таблица 9, Фигура 47).

Таблица 9: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA-Ag^0)/PAH и P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH /PPIX-ED покрития върху неръждаема стомана

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
P(mDOPA)-co- P(DMAEMA$^+$) / Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH	13.1	15.0
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) / Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH/PPIX-ED	14.0	17.4



Фиг. 47: Антибактериална активност на 1) P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/Ag^0/PAH и 2) P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH/PPIX-ED срещу *B. Subtilis* и *E. coli.*

6. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и PPIX-ED/AgNps комплекс

6.1. Синтез на комплекс на основата на амино модифициран протопорфирин IX(PPIX-ED) и сребърни наночастици (PPIX-ED/AgNps)

Интерес представлаваше да се направи съпоставка в механичните свойства и антибактериална активност на покрития, при които последния слой е съставен от протопорфирин с включени сребърни наночастици, с описаните дотук. Поради това са получени фотоактивни антибактериални покрития върху SS субстрат, като последният изграждащ слой се състои от комплекса на амино модифициран протопорфирин IX с

включени сребърни наночастици (PPIX-ED/AgNPs). По този начин молекулите на порфирина ще абсорбират светлина и ще проявяват антибактериална активност, а сребърните наночастици, освен че ще подсилят антибактериалната активност, ще осигурят защита на порфирина срещу фотоизбелване и запазване на енергията чрез потискане на неговата луминесценцията [26]. Ето защо е синтезиран PPIX-ED/AgNPs комплекс, съгласно схема 12.

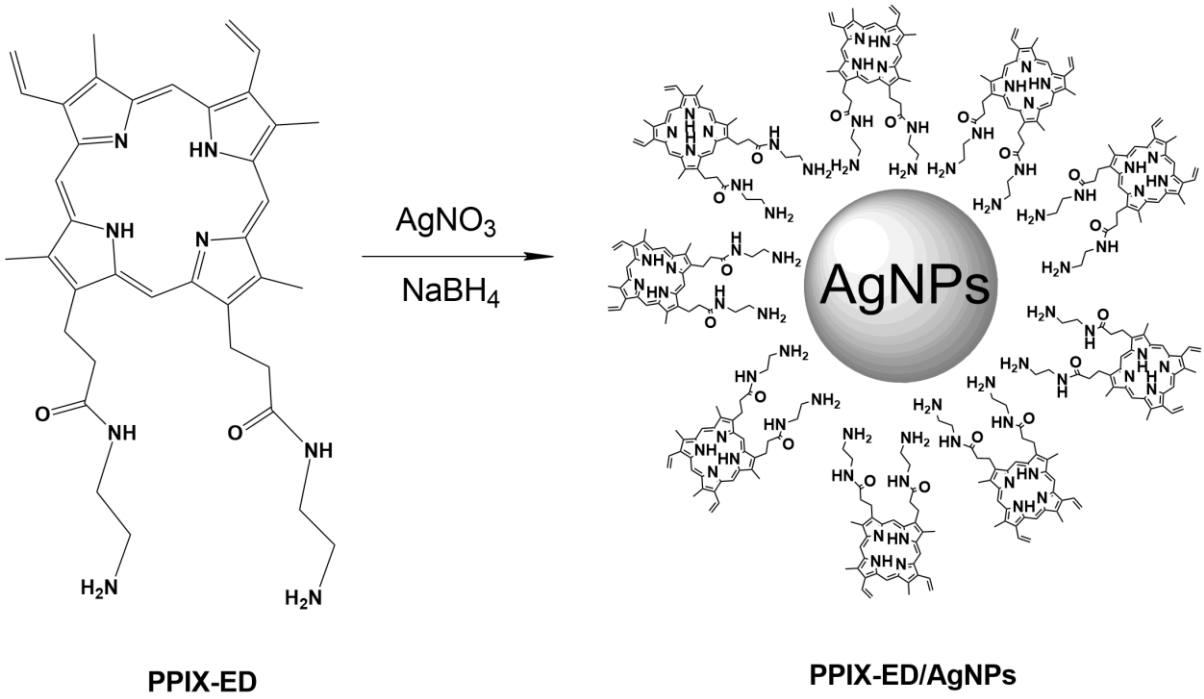


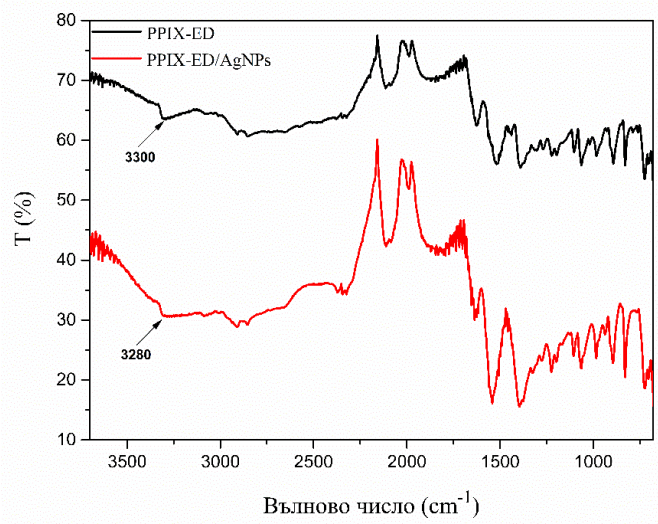
Схема 12: Стратегия за получаване на комплекс на основата на амино модифициран протопорфирин IX с включени сребърни наночастици (PPIX-ED/AgNPs).

Това е постигнато като е използван $AgNO_3$ като прекурсор на сребро в присъствие на амино модифицирания PPIX-ED и $NaBH_4$ като редуциращ агент. Известно е, че свободните амино групи от лиганда могат да бъдат използвани за фиксиране на метални наночастици [27, 28]. Получаването на PPIX-ED/AgNPs е доказано чрез инфрачервена и флуоресцентна спектроскопия, размерът и морфологията на получения PPIX-ED/AgNPs е определен чрез TEM анализ.

6.1.1.ATR-FTIR анализ на получения PPIX-ED/AgNPs комплекс

ATR-FTIR спектърът на PPIX-ED/AgNPs също показва формирането на комплекса, като е забелязано отместване с 20 cm^{-1} на пика при N-H групата (3280 cm^{-1}) в сравнение с амино модифицирания PPIX-ED при 3300 cm^{-1} (Фигура 48). Отместването на пика при N-H вибрациите вероятно е резултат от електростатични взаимодействия между NH_2 и сребърните наночастици, както е отбелязано и в [29]. Наблюдават се и другите

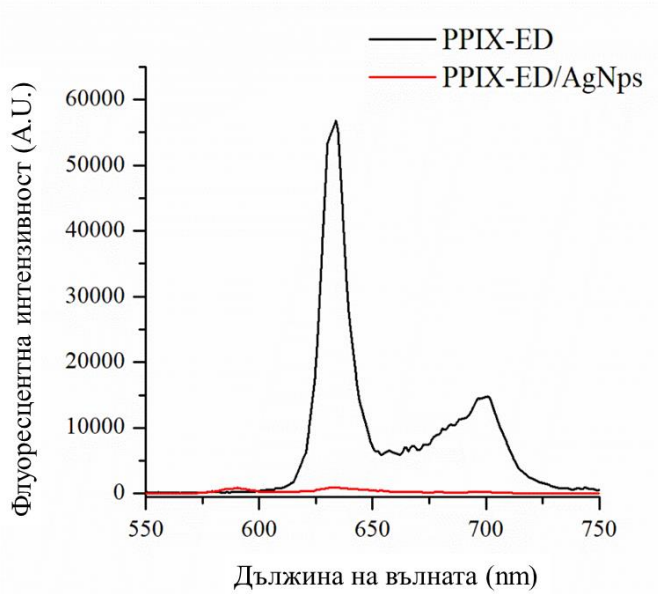
характеристични пикове за PPIX-ED при 2898 cm^{-1} за ν_{as} (–CH_2–); 2858 cm^{-1} за ν_s(–CH_2); 1619 cm^{-1} за ν (C=O) of –CONH– (Amide I band) и 1530 cm^{-1} за δ(N-H) of –CONH– (Amide II band).



Фиг. 48: FTIR спектър на амино-модифициран PPIX-ED и PPIX-ED/AgNps комплекс.

6.1.2. Флуоресцентен анализ на получения PPIX-ED/AgNPs комплекс

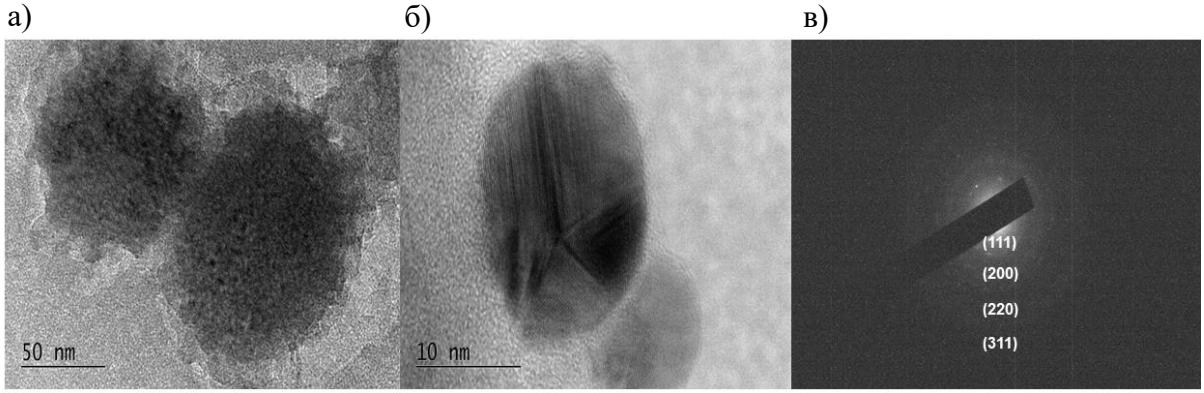
Флуоресцентният анализ на получения PPIX-ED/AgNPs комплекс показа, че флуоресцентната емисия е напълно погасена (Фигура 49). Това се дължи на трансфер на енергия от възбуденото състояние на флуорофора към съседните метални наночастици, което потвърждава образуването на комплекса PPIX-ED/AgNPs. Подобни наблюдения са описани и от Лютаков и др., където възбудено състояние на тетрафенилпорфирин (TPP) се прехвърля към AgNPs, което е доказателство за формирането на комплекса [26].



Фиг. 49: Флуоресцентен спектър на PPIX-ED/AgNPs

6.1.3.TEM анализ на получения PPIX-ED/AgNPs

Размерът и морфологията на получения PPIX-ED/AgNPs е определен чрез TEM анализ (Фигура 50а,б). Анализът показа образуването на добре дефинирани сребърни наночастици със среден размер от 10nm, които са равномерно разпределени в PPIX-ED матрицата. Електронната дифракция в селектирана област (SAED), показа наличието на всички характерни за среброто дифракционни пръстени, които отговарят на (111), (200), (220) и (311) отражения на челно центрираната кубична решетка (fcc) на среброто и потвърждава кристалната природа на получените сребърни наночастици (Фигура 50в).



Фиг. 50: а) и б) TEM анализ на PPIX-ED/AgNPs комплекс в) SAED на PPIX-ED/AgNPs комплекс.

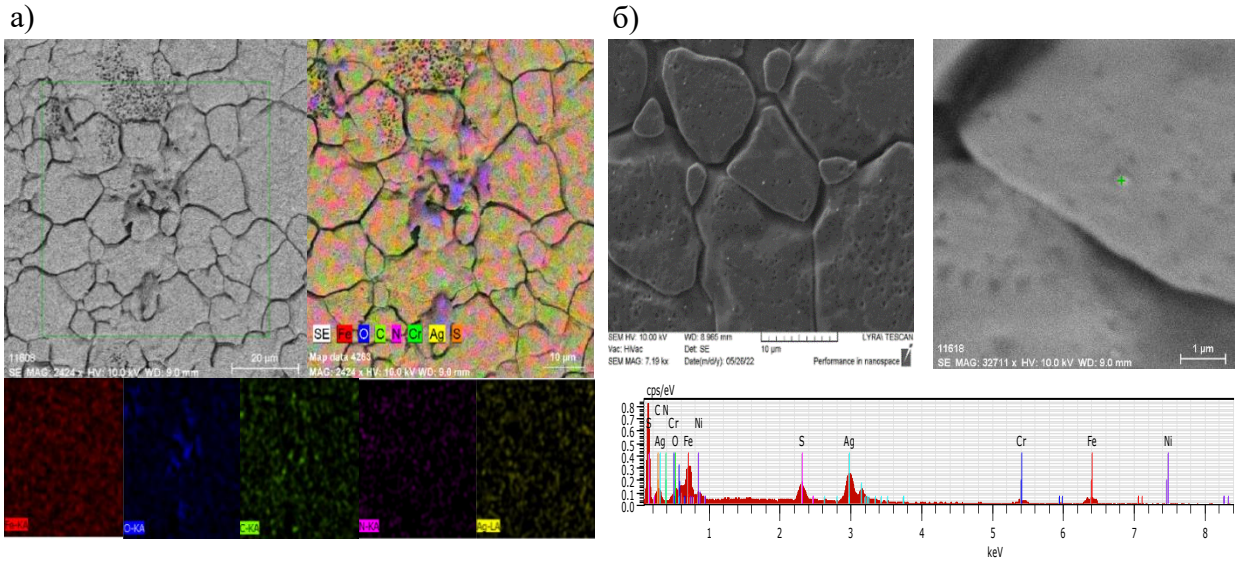
6.2. Получаване на полимерни покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и PPIX-ED/AgNps комплекс върху подложка от неръждаема стомана

Последващо, фотоактивните антибактериални покрития основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел и PPIX-ED/AgNps комплекс са получени чрез описаната вече “dip coating” процедура върху подложка от неръждаема стомана, използвайки следните компоненти: 1) като първи слой е използван поликатионен съполимер на основата на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$); 2) като втори слой е използван омрежен Pox(mDOPA)/PAH наногел; 3) като трети слой е използван PPIX-ED/AgNPs комплекс. Времето за отлагането на всеки слой е 15 мин. със стъпка на промиване с дейонизирана вода между тях.

6.2.1. EDX-SEM анализ на получените полимерни покрития на основана P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs

Получаването на покритията е доказано с помощта на EDX-SEM анализ, като картата на елементите на покритието показва равномерно разпределени въглерод (C), кислород (O), азот (N) и сребро (Ag) (Фигура 51а). Проведеният EDX-SEM анализ в точка

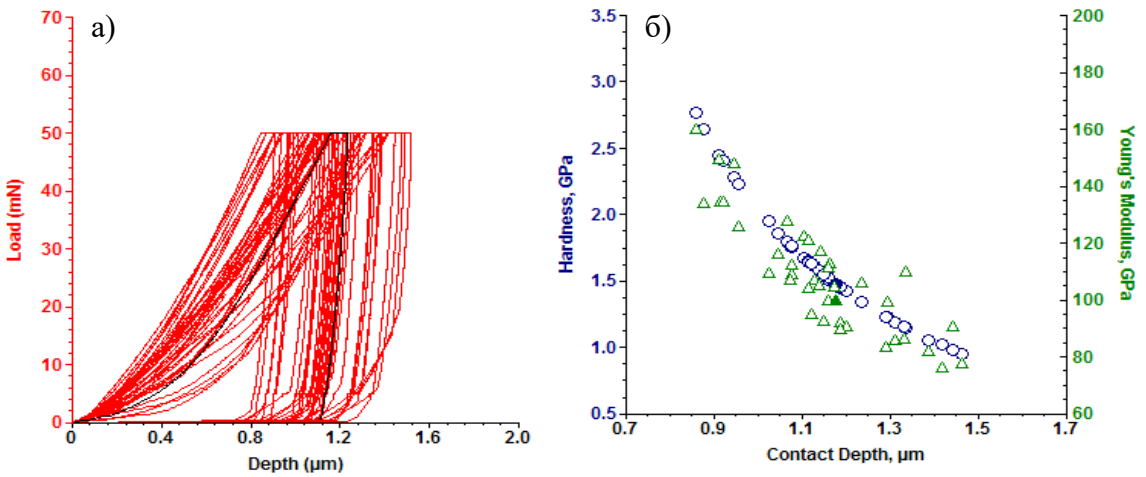
показва високо съдържане на сребро от 7.73 at.% както и наличието на C - 16.2 at. %, N - 15.6 at.% и O - 6.2 at.%, които произтичат от PPIX-ED AgNPs комплекс (Фигура 51б).



Фиг. 51: а) EDX-SEM анализ на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs покритията върху SS субстрат; б) EDX-SEM анализ в точка на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA+)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs покритията.

6.2.2. Наномеханичен анализ на получените полимерни покрития на основана P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs

Механичните свойства на получените покрития са определени чрез наноиндентация, която позволява едновременно оценяване на твърдостта (H) и модула на еластичност (E) като функция от контактната дълбочина. Наблюдава се линейно намаляване на стойностите на H и E с увеличаване на контактната дълбочина, което може да се обясни с нарастване на градиентите на изместване от втори ред при използване на Berkovich тип индентор (Фигура 52) [30].



Фиг. 52: а) Криви на натоварване – разтоварване от 48 наноидентации и б) Твърдост и модул на еластичност като функция от дълбочината на контакта на полученото P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs полимерно покритие

Получените средни стойности на H и E за покритието върху SS субстрат са съответно 1,64 GPa и 108,5 GPa, което е показателно за добри механични свойства на покритията.

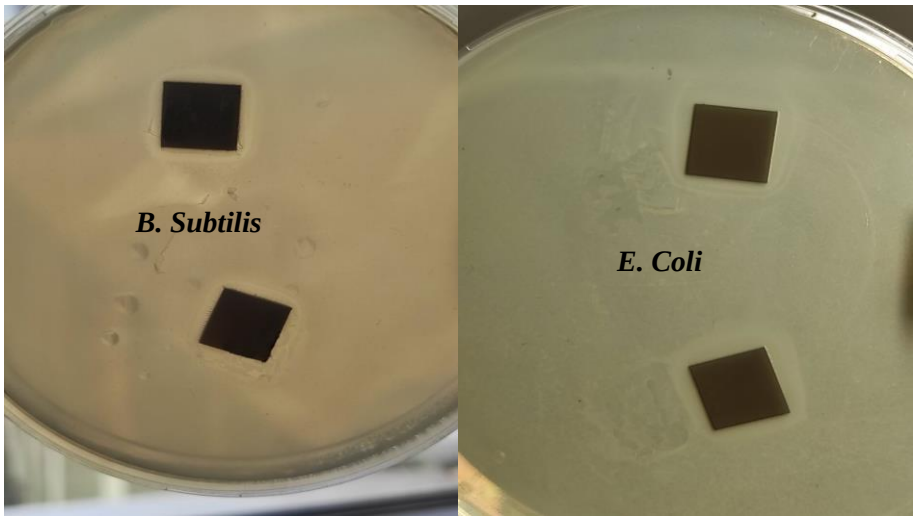
6.2.3. Антибактериална активност на получените полимерни покрития на основана на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNPs

Последващо е определена и антибактериалната активност на полученото P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNps покритие срещу грам-отрицателните *E. Coli* и грам-положителните *B. Subtilis* бактерии, използвайки модифицирания дисково дифузионен метод. Установено е, че получените покрития притежават отново силно изявена антибактериална активност с появата на зони на потискане между 14.5-17.5 mm (Таблица 10, Фигура 53). Наблюдава се по-висока антибактериална активност срещу Грам отрицателните *E. coli* в сравнение с Грам положителни *B. subtilis*, което се дължи на разликата в тяхната мембранна структура.

Таблица 10: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNps покритие.

Проба	**B. subtilis** Зона на потискане (mm)	**E. coli** Зона на потискане (mm)
P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIXED/AgNps	14.5	17.5

а) б)



Фиг. 53: Антибактериална активност на P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+}) /Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED/AgNps покритие срещу а) *B. subtilis* и б) *E. Coli*

VI. Изводи

- Синтезиран е наногел на основата на поли(N-метакрилоил 3,4-дихидрокси-L-фенилаланин метил естер) (P(mDOPA)) и поли(алиламин хидрохлорид) (PAH), използвайки амин/хинонови взаимодействия. Успешното формиране на наногелове е постигнато чрез окисление на DOPA групите в базични условия и последващо взаимодействие с PAH, съдържащ първични амино групи. Морфологията и размерът на получените наногелове са определени чрез динамично разсейване на светлина (DLS) и трансмисионна електронна микроскопия (TEM).

- Успешно са получени покрития на основата на Pox(mDOPA)/PAH наногел върху подложка от неръждаема стомана чрез „dip coating“ процедура, използвайки като първи слой поликатионния P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер, а следващия слой е изграден от наногела на базата на Pox(mDOPA)/PAH. Отлагането на полимерните слоеве е проследено с използването на кварцово кристална микровезна (QCM-D) и е потвърдено от ATR-FTIR спектроскопия. Механичните свойства на полученото покритие са изследвани чрез микротест за устойчивост на надраскване, в резултат на което е установено, че те притежават добра устойчивост на надраскване и адхезивна здравина на покритията върху използваната подложа от SS.

- Успешно е осъществена модификация на фотосенсибилизатора 9-аминоакридин, с оглед създаването на подходяща функционална амино група, чрез която да бъде осъществена реакцията на ковалентно свързване към Pox(mDOPA)/PAH функционалните наногелове чрез амин/хинононови взаимодействия, която е доказана чрез ATR-FTIR и NMR анализи и потвърдена от проведените фотофизични изследвания.

- Получени са фотоактивни полимерни покрития върху подложка от неръждаема стомана чрез последователно отлагане на три слоя, поликатионния P(mDOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) съполимер, наногела на базата на Pox(mDOPA)/PAH и модифицирания 9-аминоакредин 3. Повърхностните и механични свойства на получените покрития са изследвани чрез AFM, тест за устойчивост на надраскване и наноиндентация, чрез които е установено, че покритията притежават добри адхезионни и механични свойства. Установено е, че получените фотоактивните

полимерни покрития притежават силна антибактериална активност срещу грам-отрицателните *E. coli*.

- Проведена е модификация на фотосенсибилизатор протопорфин IX за създаването на подходяща функционална амино група в структурата, която да участва в ковалентно свързване към съответните функционални наногелове чрез амин/хинононови взаимодействия и получаването на фотоактивни полимерни покрития. Модифицирания амино протопорфирин (PPIX-ED) е охарактеризиран чрез ATR-FTIR, ^{1}H NMR, UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия, които потвърждават успешната модификация. Установено е, че полученият PPIX-ED показва изразена антибактериална активност спрямо Грам-отрицателните *E. Coli* и Грам-положителните *B. Subtilis* щамове.

- Модифицираният амино протопорфирин (PPIX-ED) е използван за получаването на фотоактивни полимерни покрития върху подложка от неръждаема стомана, които са получени чрез последователно отлагане на поликатионния P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+}) съполимер като първи слой, Pox(mDOPA)/PAH наногел като втори слой, и трети слой – PPIX-ED. Отлагането на слоевете върху SS субстрата е потвърдено чрез енергийно-дисперсивен рентгенов анализ и сканираща електронна микроскопия (EDX-SEM). Механичните свойства на получените P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+})/Pox(mDOPA)/PAH/PPIX-ED покрития са определени чрез подходящи тестове, които показват, че те притежават добри механични свойства.

- 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)-Ag0/PAH) е охарактеризиран с подходящи техники като трансмисионна електронна микроскопия (TEM), динамично разсейване на светлина (DLS) и електронна дифракция в селектирана област (SAED), които показват формирането на сребърни наночастици включени в полимерния наногел. Полученият Pox(mDOPA)-Ag^{0}/PAH) наногел показва изразена антибактериална активност спрямо Грам-отрицателните *E. Coli* и Грам-положителните *B. Subtilis* щамове.

- Получени са полимерни покрития върху SS, чрез “dip coating” процедура, с използването на поликатионния (P(mDOPA)-co-P(DMAEMA^{+}) съполимер и Pox(mDOPA)-Ag^{0}/PAH наногела. Отлагането на двата слоя 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. В резултат на проведените механични изпитания е установено, че получените покрития притежават добра адхезия, устойчивост на надраскване и добри механични свойства.

- Получени са фотоактивни полимерни покрития с включени сребърни наночастици, чрез проведена функционализация на полимерното покритие с фотосенсибилизатор на основата на протопорфирин. 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. От проведените механични изпитания може да бъде 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 фотоактивни покрития, при които последният слой е съставен от 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 наноиндентация 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.

- Антибактериалните свойства на модифицираните с фотосенсибилизатор PPIX-ED полимерни покрития са определени срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, чрез дисково дифузионен метод (DDM). Резултатите показват, че всички покрития притежават силно антибактериална активност, която е по-ясно изразена

спрямо Грам-отрицателните бактерии. 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 антибактериална активност, както и на антибактериалната активност на сребърните наночастици, което се дължи на алтернативен механизъм на действие.

VII. Приноси

1. За първи път са получени фотоактивни полимерни покрития върху подложка от неръждаема стомана на основата на полимерен наногел и амино модифициран фотосенсибилизатор на основата на 9-аминоакридин.
2. За първи път са получени фотоактивни полимерни покрития на основата на полимерен наногел (тип „in") с включени сребърни наночастици (Pox(mDOPA)-Ag^0/PAH) и фотосенсибилизатор – амино модифициран протопорфирин IX, както и такива използвайки комплекс от амино модифициран протопорфирин IX с включени сребърни наночастици като последен слой. Фотоактивните покрития са получени, използвайки LbL техниката чрез потапяне („dip coating"), върху подложка от неръждаема стомана.
3. Резултатите от проведените изследвания за антибактериална активност демонстрират, че получените покрития могат да се използват като платформа за получаване на антибактериални полимерни покрития за различни приложения в областта на медицината.

VIII. Публикации по дисертационната работа

1. Nikoleta Philipova, Rayna Bryaskova, **Surface and mechanical properties of bio-inspired nanogel coatings**, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 56(4), 671-677, (2021).
2. Rayna Bryaskova, Nikoleta Philipova, Nikolay Georgiev, Ivo Lalov, Vladimir Bojinov and Christophe Detrembleur, **Photoactive Mussels Inspired Polymer Coatings: Preparation and Antibacterial activity**, Journal of Applied Polymer Science, 138(31), (2021)
3. N. Philipova, D. Ganchev, I. Lalov and R. Bryaskova, **Design, preparation, and antibacterial activity of light-activated polymer coatings**, Bulgarian Chemical Communication, 54 (4), 332-336, (2022).
4. Nikoleta Philipova, Nikolay Georgiev, Damyan Ganchev, Ivo Lalov, Rayna Bryaskova, **Porphyrine/silver nanoparticles based photoactive antibacterial coatings**, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 58(2), 275-282, (2022).
5. Bryaskova, R., Philipova, N., Georgiev, N., Ganchev, D., Lalov, I. and Detrembleur, C., **Bio-inspired antibacterial polymer coatings with included silver nanoparticles and porphyrin-based photosensitizer**, Journal of Polymer Research, 30 (6), 199 (2023).

Участие в конференции по дисертационната работа

1. N. Filipova, N. Mineva, S. Ismail, R. Bryaskova, **Novel photoactive nanogels for medical applications**, XVII научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти - 26.06.2020, ХТМУ, София, България.
2. N. Filipova, N. Georgiev, I. Lalov, R. Bryaskova, **Novel photoactive polymer coatings: properties and antibacterial activity**, XI научна сесия „Младите учени в света на полимерите“ – 10.09.2020г., Институт по полимери – БАН, София, България.
3. Николета Филипова, Райна Бряскова, **Получаване на фотоактивни полимерни покрития: Дизайн и свойства**; XII национална младежка научно-практическа конференция, Федерация на научно-техническите съюзи, 12-13.11. 2020г.
4. Николета Филипова, Николай Георгиев, Райна Бряскова, **Дизайн и синтез на полимерни покрития с включен фотосенсибилизатор на основата на порфирин**, XVIII Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти - 25.06.2021, ХТМУ, София, България.
5. Nikoleta Philipova, Rayna Bryaskova, **Preparation and surface characteristics of bio - inspired antibacterial polymer coatings with included porphyrin based photosensitizer**, Eleventh National Conference on Chemistry – 23-25.06. 2022 , Sofia, Bulgaria.

6. N. Philipova, R. Bryaskova, **Design of novel photoactive coatings for medical applications**, 20-th Symposium POLYMERS 2022 – 5-8.07.2022, Velingrad, Bulgaria.
7. N. Philipova, R. Bryaskova, Christophe Detrembleur, **Design and sythesis of bio – inspired antibacterial polymer coatings for medical applications**, International Conference on Materials and Nanomaterials, 25-27.07.2022, Rome, Italy;
8. N. Filipova, R. Bryaskova, **Novel Photoactive Antibacterial Polymer Coatings**, Global Conference on Materials Science and Engineering, 07-09.11.2022, Valencia, Spain;

Използвана литература

1. Faure, E., Lecomte, P., Lenoir, S., Vreuls, C., Van De Weerdt, C., Archambeau, C., Martial, J., Jérôme, C., Duwez, A., Detrembleur, C. (2011). Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel. Journal of Materials Chemistry, 21(22), 7901.

2. Lee, H., Scherer, N. F., Messersmith, P. B. (2006). Single-molecule mechanics of mussel adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(35), 12999-13003.

3. Marx, K. A. (2003). Quartz crystal Microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex Biomolecular systems at the Solution−Surface interface. Biomacromolecules, 4(5), 1099-1120.

4. G.Z. Sauerbrey, The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing, Phys., 155, 1959, 206-222.

5. Hsu, L. C., Fang, J., Borca-Tasciuc, D. A., Worobo, R. W., and Moraru, C. I. (2013). Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 79(8), 2703-2712.

6. Friedlander, R. S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M., Kolter, R., and Aizenberg, J. (2013). Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(14), 5624-5629.

7. Whitehead, K., and Verran, J. (2006). The effect of surface topography on the retention of microorganisms. Food and Bioproducts Processing, 84(4), 253-259.

8. Crawford, R. J., Webb, H. K., Truong, V. K., Hasan, J., and Ivanova, E. P. (2012). Surface topographical factors influencing bacterial attachment. Advances in Colloid and Interface Science, 179-182, 142-149.

9. Jennett NM, Owen-Jones S (2002) The scratch test: calibration, verification and the use of a certified reference material, NPL Measurement Good Practice Guide No. 54

10. Wainwright, M., Phoenix, D. A., Marland, J., Wareing, D. R., Bolton, F. J. (1997). In-vitro photobactericidal activity of aminoacridines. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 40(4), 587-589.

11. Wainwright, M. (2001). Acridine--a neglected antibacterial chromophore. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47(1), 1-13.

12. Borovlev, I. V., Demidov, O. P., Amangasieva, G. A., and Avakyan, E. K. (2016). Direct and facile synthesis of 9-aminoacridine and acridin-9-yl-ureas. Tetrahedron Letters, 57(32), 3608-3611.

13. Vreuls, C., Zocchi, G., Vandegaart, H., Faure, E., Detrembleur, C., Duwez, A., Martial, J., Van De Weerdt, C. (2012). Biomolecule-based antibacterial coating on a stainless steel surface: Multilayer film build-up optimization and stability study. Biofouling, 28(4), 395-404.

14. Faure, E., Vreuls, C., Falentin-Daudré, C., Zocchi, G., Van de Weerdt, C., Martial, J., Jérôme, C., Duwez, A., and Detrembleur, C. (2012). A green and bio-inspired process to afford durable anti-biofilm properties to stainless steel. Biofouling, 28(7), 719-728.

15. Fischer-Cripps, A., Nicholson, D. (2004). Nanoindentation. Mechanical engineering series. Applied Mechanics Reviews, 57(2), B12-B12

16. Oliver, W., Pharr, G. (2004). Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. Journal of Materials Research, 19(1), 3-20.

17. Bozja, J., Sherrill, J., Michielsen, S., Stojiljkovic, I. (2003). Porphyrin-based, light-activated antimicrobial materials. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 41(15), 2297-2303.

18. Sherrill, J., Michielsen, S., Stojiljkovic, I. (2002). Grafting of light-activated antimicrobial materials to nylon films. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 41(1), 41-47.

19. Reis, E., Metze, K., Nicola, E., Nicola, J., Borissevitch, I. (2013). Photodynamic activity of protoporphyrin IX in Harderian glands of Wistar rats: Monitoring by gland fluorescence. Journal of Luminescence, 137, 32-36.

20. Javed, F., Samaranayake, L. P., Romanos, G. E. (2014). Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: A systematic review of currently available evidence. Photochemical and Photobiological Sciences, 13(5), 726-734.

21. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C., Kim, Y., Lee, Y., Jeong, D. H., Cho, M. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1), 95-101.

22. Vasilev, K. (2019). Nanoengineered antibacterial coatings and materials: A perspective. Coatings, 9(10), 654.

23. Lei, Z., Zhang, L., and Wei, X. (2008). One-step synthesis of silver nanoparticles by sonication or heating using amphiphilic block copolymer as templates. Journal of Colloid and Interface Science, 324(1-2), 216-219.

24. Batakliev, T., Ivanov, E., Angelov, V., Spinelli, G., Kotsilkova, R. (2022). Advanced Nanomechanical characterization of Biopolymer films containing GNPs and MWCNTs in hybrid composite structure. Nanomaterials, 12(4), 709.

25. Němeček, J., Lukeš, J., and Němeček, J. (2020). High-speed mechanical mapping of blended cement pastes and its comparison with standard modes of nanoindentation. Materials Today Communications, 23, 100806.

26. Lyutakov, O., Hejna, O., Solovyev, A., Kalachyova, Y., Svorcik, V. (2014). Polymethylmethacrylate doped with porphyrin and silver nanoparticles as light-activated antimicrobial material. RSC Adv, 4(92), 50624-50630.

27. Luan, Y., Qi, Y., Gao, H., Zheng, N., and Wang, G. (2014). Synthesis of an amino-functionalized metal–organic framework at a nanoscale level for gold nanoparticle deposition and catalysis. J. Mater. Chem. A, 2(48), 20588-20596.

28. Li, X., Zhang, B., Fang, Y., Sun, W., Qi, Z., Pei, Y., Qi, S., Yuan, P., Luan, X., Goh, T. W., Huang, W. (2017). Metal–organic-framework-Derived carbons: Applications as solid-base catalyst and support for PD nanoparticles in tandem catalysis. Chemistry – A European Journal, 23(18), 4266-4270.

29. Dutta, G., Jana, A. K., Singh, D. K., Eswaramoorthy, M., and Natarajan, S. (2018). Encapsulation of silver nanoparticles in an amine-functionalized porphyrin metal–organic framework and its use as a heterogeneous catalyst for CO2 fixation under atmospheric pressure. Chemistry – An Asian Journal, 13(18), 2677-2684.

30. Han, C., Sanei, S. H., and Alisafaei, F. (2015). On the origin of indentation size effects and depth dependent mechanical properties of elastic polymers. Journal of Polymer Engineering, 36(1), 103-111.