



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Цветелина Георгиева Ангелова

**АНТИМИКРОБНИ ХИБРИДНИ МАТЕРИАЛИ НА
ОСНОВАТА НА ЦЕЛУЛОЗНИ ПРОИЗВОДНИ С ВКЛЮЧЕНИ
СРЕБЪРНИ НАНОЧАСТИЦИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия,
химия на природните и физиологично активните вещества)

Научен ръководител: доц. д-р Нели Георгиева

Научно жури:

1. проф. д-р инж. Любов Йотова – председател, рецензент
2. проф. Мария Ангелова, дбн – рецензент
3. доц. Светла Данова, дбн
4. доц. д-р Светла Илиева
5. доц. д-р Нели Георгиева

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 147 страници, съдържа 98 фигури и 6 таблици. Цитирани са 206 източника. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 07.04.2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 13.06.2016 г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Сърдечно благодаря на научния ми ръководител доц. д-р Нели Георгиева за насърчаването и изключително полезните съвети и идеи по време на целия процес по подготовката на настоящата работа. Признателна съм за усилията, търпението и голямата отзивчивост през изминалите пет години.

Благодаря на всички колеги от ХТМУ, Института по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН и Института по обща и неорганична химия, БАН за съвместната работа и помощта им.

Изказвам благодарност за получената финансова подкрепа от програма Erasmus и DAAD и за възможността да извърша част от експериментите в TVXX Хамбург, Германия. Благодаря на проф. Мюлер и работната му група за проявеното внимание и съвети по време на престоя ми там. Благодаря още за финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания”: Договор DDVU 02-96/2010-2013 г., на оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“, както и на програма Erasmus Mundus за възможността да участвам в лекционен курс в Болоня, Италия.

Не на последно място бих желала да благодаря и на семейството ми за обичта, подкрепата и вярата в мен.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AgNps	Сребърни наночастици
AFM	Атомно-силова микроскопия
CFU	Колония-формиращи единици
CMC	Карбоксиметил целулоза
EDS	Микросондов химичен анализ
HPMC	Хидроксипропилметил целулоза
HPC	Хидроксипропил целулоза
IR-spectroscopy	Инфрачервена спектроскопия
SEM	Сканираща електронна микроскопия
TEM	Трансмисионна електронна микроскопия
TEOS	Тетраетилорто силикат

ВЪВЕДЕНИЕ

Микроорганизмите са най-разпространените живи организми на планетата и голяма част от тях са патогени. През последните години се наблюдава все по-голям брой инфекциозни заболявания, причинени от различни патогенни бактерии, резистентни към антибиотици. Много от тези инфекции са причинени от микроорганизми, формиращи биофилми и агломерации от бактерии, прикрепени към твърда повърхност. Те се оказват резистентни към различни лекарствени средства, дезинфектанти и др., не се повлияват от имунния отговор на човека и водят до развитие на хронични заболявания. Биофилмите могат да се формират върху импланти, медицински инструменти, лабораторна техника и апаратура, операционни помещения и създават сериозен проблем за здравето на човека. Поради липсата на ефективни антибиофилмови антибиотици, възниква необходимостта за откриване на нови и по-ефективни антимикробни агенти. Усилията на учените са насочени към изследване антибактериалното действие на наночастици самостоятелно или включени в материали. Сред различните метални наночастици особено внимание е фокусирано върху сребърните поради техните уникални физични и химични свойства и изразена антибактериална активност. Добре известно е, че среброто и сребърните йони са ефективни антимикробни агенти спрямо бактерии, вируси и плесени. Изразената антибактериална активност на сребърните наночастици се дължи на добре развитата им повърхност, която осигурява по-добър контакт с микроорганизмите.

Хибридните материали, включващи в своя състав силиций и полимер, предизвикват голям интерес в научната сфера поради тяхната добра биосъвместимост и възможност за приложение в медицината. Биосъвместимостта е пряко зависима от физикохимичните свойства на биоматериала като хидрофилно-хидрофобен баланс, грапавост, наличие на различни функционални групи. Органичните полимери служат като отлични стабилизатори за сребърните наночастици и намират разнообразно приложение. Съчетанието между изразени антимикробни свойства, ниска цитотоксичност и потенциална биосъвместимост на хибридни материали, съдържащи неорганичен, органичен компонент и метални наночастици, е интересно и обещаващо направление за изследване, с цел решаване на много здравни и екологични проблеми.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на антимикробната активност на хибридни материали на основата на различни целулозни етери и тетраетилортосиликат с включени сребърни наночастици спрямо тест култури на бактерии, дрожди и плесени, проследяване антибиофилмовата активност и цитотоксичността.

Във връзка с постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Изследване морфологията на синтезирани зол-гелни SiO₂ хибридни материали с различна концентрация на сребро и различни целулозни етери.
2. Проследяване активността на материалите с различна концентрация на сребро:
 - спрямо бактерии - *Escherichia coli* K12 и *Bacillus subtilis* 356;
 - спрямо дрожди - *Saccharomyces cerevisiae* 537 и *Candida albicans* 74;
 - спрямо плесени - *Aspergillus niger* 371 и *Penicillium chrysogenum* 2303.
3. Сравнително определяне ефекта на хибридните материали спрямо различни таксономични групи микроорганизми (бактерии, дрожди и плесени).
4. Изследване ефекта на хибридните материали по отношение на адхезията и биофилм формирането на щам *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.
5. Оценка ефекта на хибридните материали върху клетъчната пролиферация и адхезивността на миши фибробласти в моделна система.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и апаратура

- А) Материали и апаратура, използвани за синтез на хибридни материали по зол-гелен метод
- Б) Материали и апаратура, използвани за определяне антимикробното действие на хибридните материали
- В) Материали и апаратура, използвани за изследване ефекта на хибридните материали по отношение на адхезията и биофилм формирането на щам *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
- Г) Материали и апаратура, използвани за изследване на клетъчната преживяемост и адхезивната способност на миши фибробласти

2. Методи

- А) Методи за структурен анализ на получените хибридни материали
- Б) Методи за определяне антимикробното действие на хибридни материали

1. *Агар-дифузионен метод*

2. *Отчитане на CFU и изчисляване клетъчното инхибиране (%) на бактериални и дрождеви щамове след контакт с изследваните хибридни материали*

3. *Определяне антигъбното действие на хибридните материали посредством контакт между щама и изследваните проби*

- В) Метод за изследване ефекта на хибридните материали по отношение на адхезията и биофилм формирането на щам *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
- Г) Методи за изследване ефекта на хибридните материали върху клетъчната пролиферация и адхезивността на миши фибробласти в моделна система

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Синтез на хибридните материали по зол-гелен метод

В настоящия дисертационен труд синтезът на хибридни материали на базата SiO_2 /целулозни производни и включени сребърни наночастици е проведен съгласно методологията, описана в предишния раздел, а химизмът е отразен на фиг. 1 и фиг. 2. Първият етап е хидролиза и кондензация на тетраетилортосиликат (TEOS), прекурсор на SiO_2 (фиг. 1). По време на хидролизата (1), алкоксидните групи (OR) се заместват с хидроксилни (OH), водещи до образуването на силанолни групи (SiOH) и отделянето на алкохол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Вторият етап отразява кондензацията (2), при която силанолните групи се свързват помежду си, образувайки силоксановите връзки (O-Si-O) и странични продукти като вода и алкохол. Кондензацията често започва преди хидролизата да е протекла напълно. По време на поликондензационния процес се образува реалната силициево-диоксидна мрежа [Kickelbick, 2007].

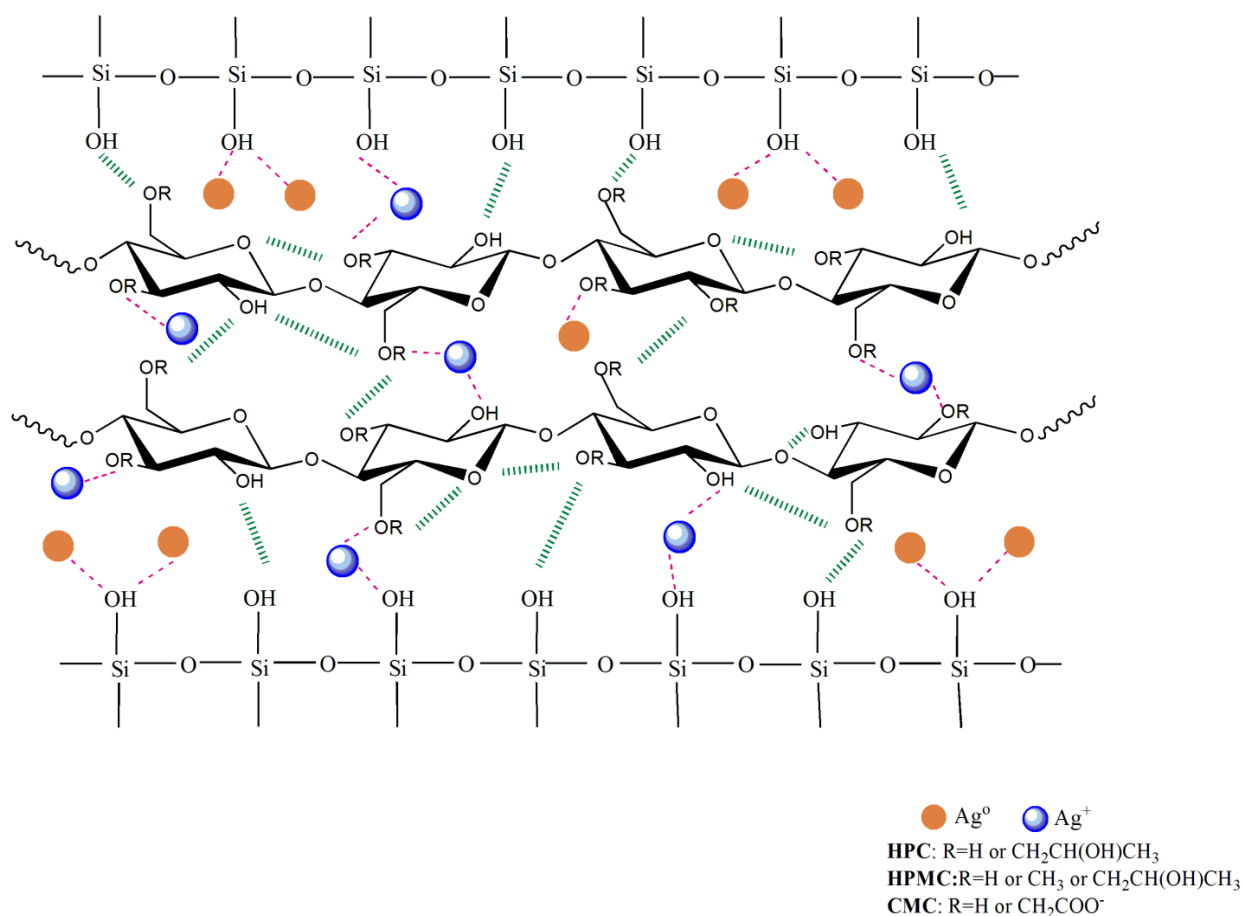


Фиг. 1 Реакции на хидролиза и кондензация на TEOS [Kickelbick, 2007]

Известно е, че НРС притежава хидроксилни функционални групи, налични в целулозната молекула, както и хидроксилни групи в края на страничните вериги, дължащи се на хидроксипропилиране. Големият брой хидроксилни групи в този полимер улеснява комплексообразуването на сребърните йони. Като прекурсор на сребърните йони е използван сребърен нитрат. Тези сребърни йони окисляват OH-групите на хидроксипропил целулозата до карбонилни групи и в резултат сребърните йони се редуцират до елементарно сребро. Нагряването на получения разтвор допълнително засилва редуцирания процес. По-нататък тези наночастици вероятно се захващат и стабилизират от полизахарида (фиг. 2). Структурата на целулозните производни като природни полимери е много сложна и най-вероятно съществува повече от един механизъм, който участва в комплексирането и последващата редукция на сребърните йони [Abdel-Halim & Al-Deyab, 2011]. Те могат да комплексират чрез хидроксилните

групи и впоследствие да бъдат редуцирани чрез алдехидните групи, както е докладвано и за наночастици, получени от нишесте [Vigneshwaran et al., 2006].

Въз основа на IR спектрите и термичният анализ е установено, че свързването при хибридите, получени с участието на сребро в присъствие на СМС и TEOS, се осъществява чрез сравнително по-малко количество Н-връзки (в сравнение с хибридите без сребро), а между полимерната макромолекула и среброто посредством слаби йонни връзки. Също така е установено, че карбоксиметил целулозата и SiO_2 успешно редуцират и стабилизират сребърните йони (Ag^+) до елементарно сребро (Ag^0), като получените сребърни частици са наноразмерни [Rangelova et al. 2014].



Фиг. 2 Вероятен механизъм на стабилизиране на сребърни йони и елементарно сребро в хибридни материали, съдържащи TEOS и различни целулозни производни

Целулозни производни като СМС [Chen et al., 2008; Hebeish et al., 2010], HPC [Abdel-Halim & Al-Deyab, 2011; Hussain et al., 2015], MC [Maity et al., 2012], както и декстран [Bankura et al., 2012] могат да бъдат използвани като редуциращи агенти на

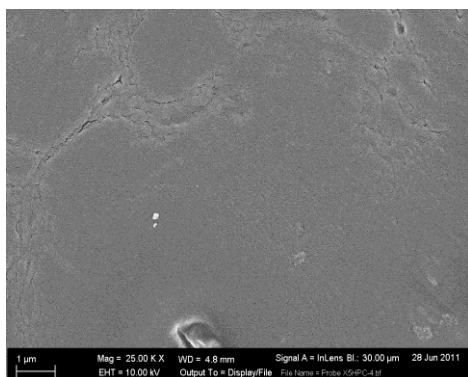
сребърните йони и стабилизатори при формиране на сребърни наночастици, предотвратяващи тяхното агломериране. Молекулите на СМС се състоят от химически модифицирани целулозни вериги, съдържащи редуциращи групи и карбоксилни групи. Те от своя страна притежават анионни свойства и позволяват използването на СМС като редуциращ и стабилизиращ агент на сребърни наночастици. Отрицателно заредената разтворима СМС улеснява привличането на положително заредените сребърни катиони към полимерните вериги, последвано от редукция чрез съществуващите редуциращи групи [Hebeish et al., 2010].

Употребата на хибридни материали на базата на СМС, силиций и сребърни наночастици се оказва успешна и при имобилизацията на амилаза. Сребърните наночастици и в този случай са получени чрез *in situ* редукция на сребърен нитрат в присъствие на СМС [Singh et al., 2012].

2. Анализи за охарактеризиране структурата на хибридните материали

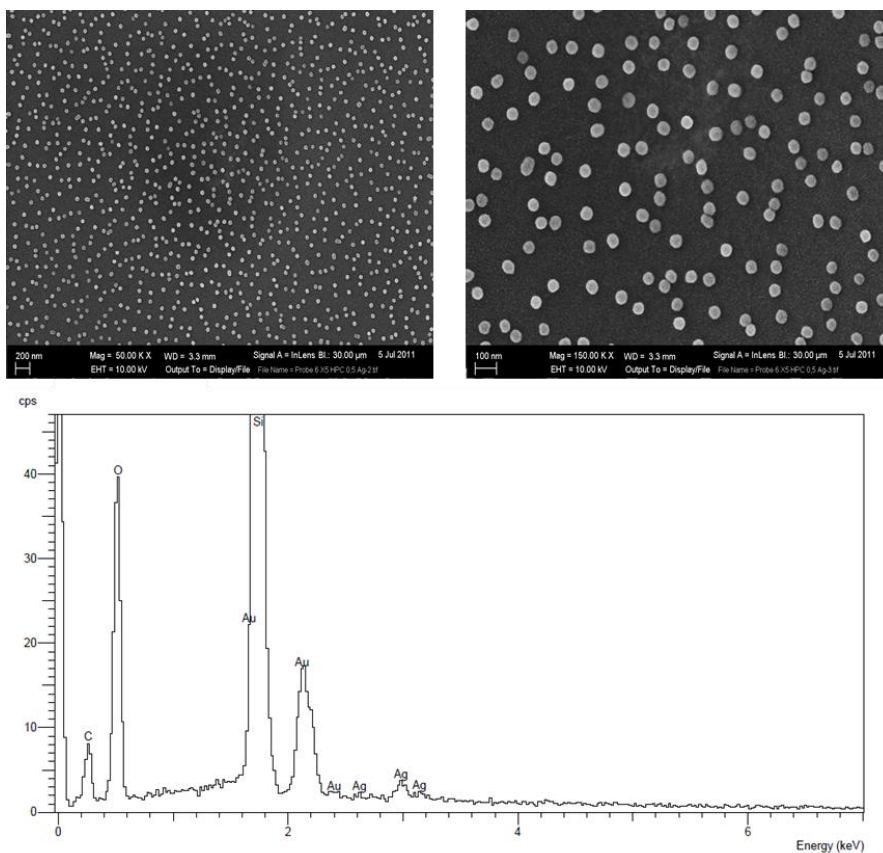
Синтезирани са хибридни материали на основата на HPC, HPMC и СМС при използване на TEOS като прекурсор на SiO_2 . Към получените матрици бяха включени сребърни наночастици с различна концентрация. Хибридните материали бяха охарактеризирани с помощта на SEM, TEM, BET и AFM-анализи.

Морфологията на получените SiO_2 /HPC, SiO_2 /HPMC и SiO_2 /СМС хибридни материали е изследвана с помощта на сканираща електронна микроскопия при различни увеличения. От SEM-изображенията (фиг. 3) се вижда, че SiO_2 /HPC хибридите притежават гладка повърхност с вълнообразен характер и хетерогенни включения, неравномерно разпределени в основната матрица. Образувалите се микрохетерегенности са със среден размер $\sim 0.5 \mu\text{m}$.



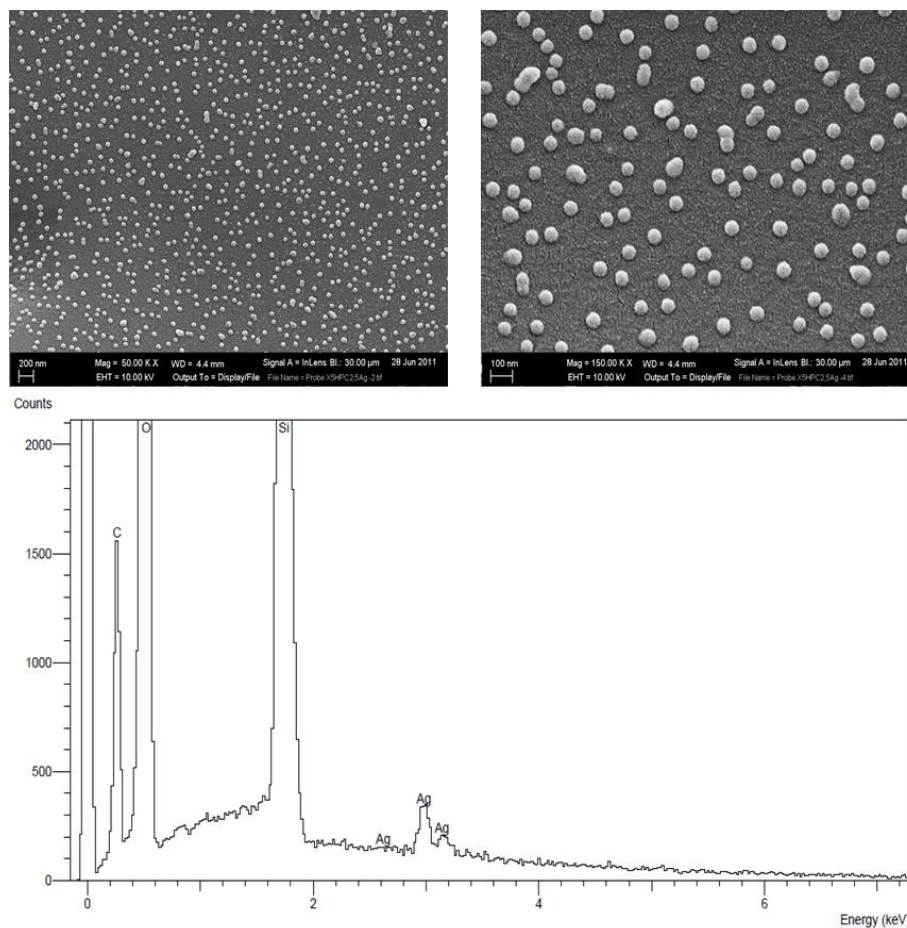
Фиг. 3 SEM-изображение на SiO_2 /HPC хибридни материали

Добавянето на 0.5 % сребро (фиг. 4) води до уплътняване на структурата. По повърхността се наблюдават сферични образувания със среден размер около 50 nm, равномерно разпределени в аморфната матрица, дължащи се на внесеното количество сребро в изследвания материал. Допълнително е направен микросондов анализ за определяне химичния състав по повърхността на образците. От спектъра ясно се вижда наличието на силно интензивен пик при около 1.7 keV, отговарящ на Si. Също така се открива и наличието на кислород, въглерод и сребро.



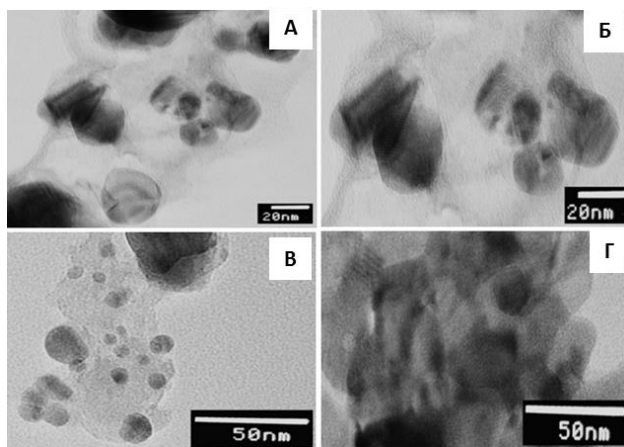
Фиг. 4 SEM и EDS изображения на SiO₂/HPC/0.5 % Ag хибридни материали, направени при различни увеличения

Добавянето на 2.5 % сребро към хибридният материал води до неравномерно разпределение на среброто в матрицата с образуването на локални агрегати (фиг. 5). За потвърждаване наличието на сребро в пробите е използван EDS-анализът. От спектъра се забелязват пикове около 3 keV, които съответстват на Ag. Химичният анализ показва наличието на по-голямо количество сребро по повърхността на хибрида.



Фиг. 5 SEM и EDS изображения на $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{Ag}$ хибридни материали, направени при различни увеличения

На фиг. 6 са представени TEM изображения на SiO_2/CMC хибридни материали с различно процентно съдържание на сребро.

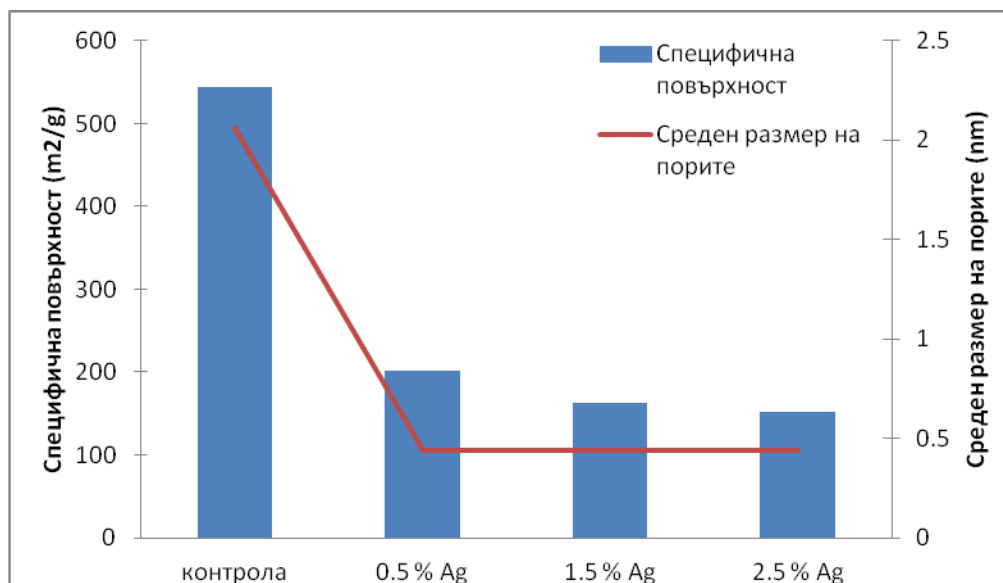


Фиг. 6 TEM изображения на SiO_2/CMC хибридни материали с 0.5 % Ag (А, Б) и 1.5 % Ag (В, Г) при различни увеличения

Забелязват се сребърни наночастици с различна форма и размер между 5-10 nm. Сребърните наночастици при материалите с 1.5 % Ag (фиг. 6 В и Г) са по-малки от частиците в проба с 0.5 % Ag (фиг. 6 А и Б).

Според класификацията на IUPAC [Sing et al., 1985] порестите материали могат да се разделят на три основни типа в зависимост от големината на порите: микропорести ($d < 2\text{nm}$); мезопорести ($2\text{nm} < d < 50\text{nm}$) и макропорести ($d > 50\text{nm}$). Възможността за получаване на макро-, мезо- или микропорести хибридни материали позволява те да бъдат широко използвани и като матрици за вграждане на активни молекули. Така например Danalev et al. (2011) получават органично-неорганични хибридни гелове с включен титаний, позволяващи бавно освобождаване на въглехидратни молекули.

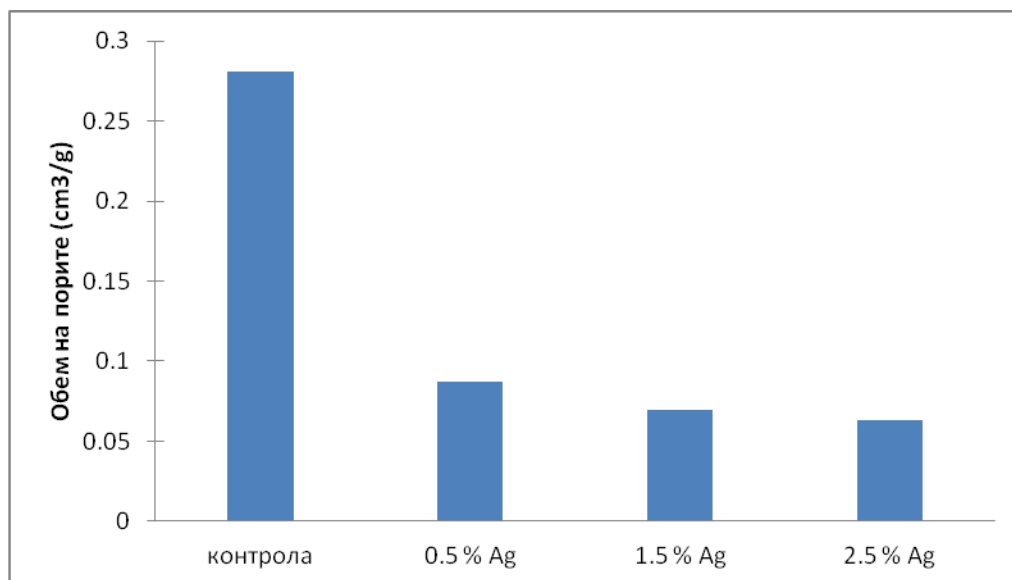
ВЕТ-анализът е използван за проследяване влиянието на количеството внесено целулозно производно и сребро върху специфичната повърхност, обема и размера на порите (фиг. 7). Най-голям размер на порите се наблюдава при чистите материали, т.е. когато среброто отсъства. В този случай са налице мезопори.



Фиг. 7 ВЕТ анализ на SiO_2/HPC хибридни материали с различно процентно съдържание на сребро

Наблюдава се тенденцията, че с увеличаване съдържанието на сребърните наночастици се намалява специфичната повърхност и обема на порите на получените хибридни материали. С добавяне на сребро размерът на порите намалява, получените материали са микропорьозни, като цяло концентрацията на сребърните наночастици не оказва съществено влияние върху средния размер на порите.

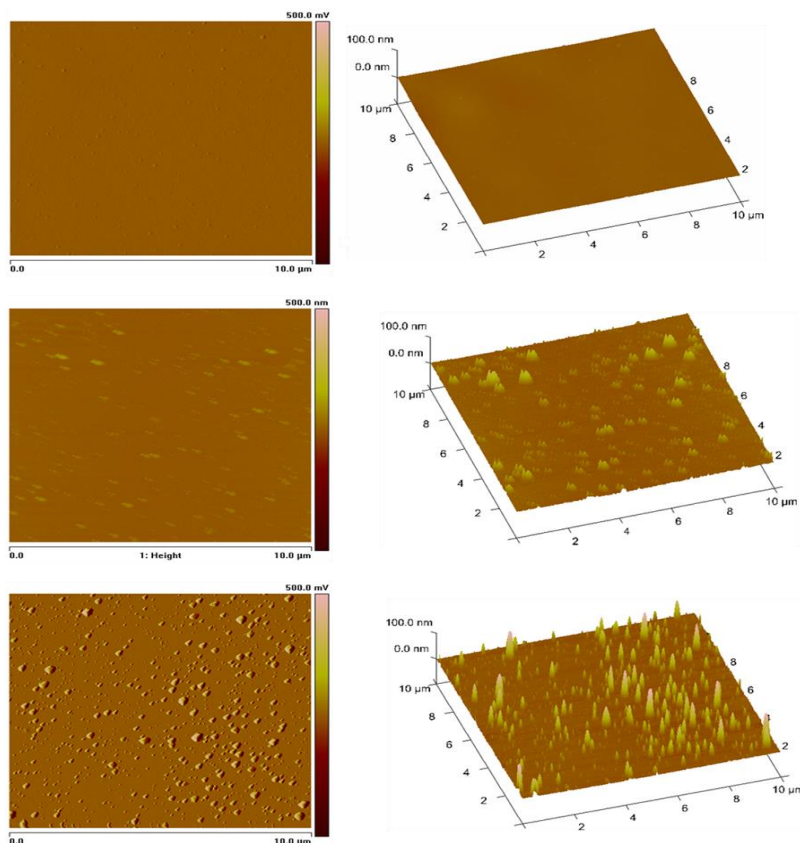
От фиг. 8 се забелязва, че, подобно на специфичната повърхност, и обемът на порите намалява с увеличаване сребърната концентрация.



Фиг. 8 Зависимост между обема на порите и количеството сребро в SiO_2/HPC хибридни материали

Повърхностната топография и грапавостта на хибридните материали бяха изследвани посредством AFM анализ. От изображенията на фиг. 9 и фиг. 10 се вижда, че контролните проби на SiO_2/HPC хибриден материал са много гладки със средна квадратична грапавост на повърхността (R_a) около 0.3 nm.

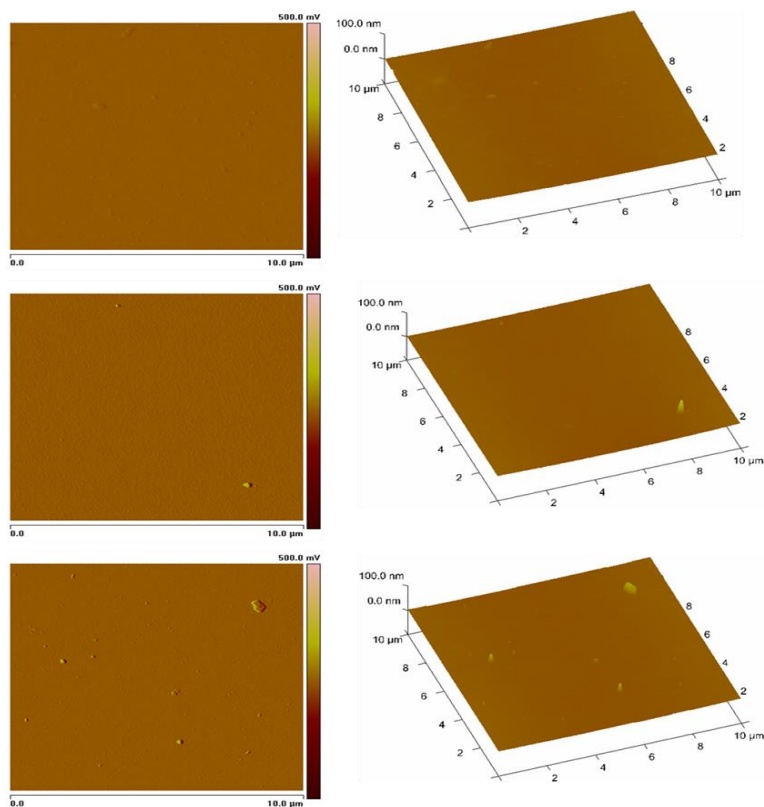
При включване на 0.5 % Ag в хибридния материал SiO_2/HPC се наблюдава промяна в повърхностната морфология, в сравнение с тази на материала без сребро. Пробите се характеризират със значително по-голяма повърхностна грапавост, дължаща се на наличието на многобройни зърнести частици с различна форма и големина, заемащи 3.0 ± 0.05 % от сканираната площ ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). Увеличаването на съдържанието на сребро до 2.5 % е последвано от формирането на многобройни и значително по-големи частици с размер около 30-200 μm , заемащи 9.5 ± 0.05 % от изследваната площ. Това вероятно се дължи на формиране на клъстери от сребърни наночастици.



Фиг. 9 AFM изображения на: SiO₂/HPC-първи ред; SiO₂/HPC/0.5% Ag – втори ред; SiO₂/HPC/2.5% Ag хибридни материали-трети ред. Вляво – 2D изображения, вдясно – 3D изображения.

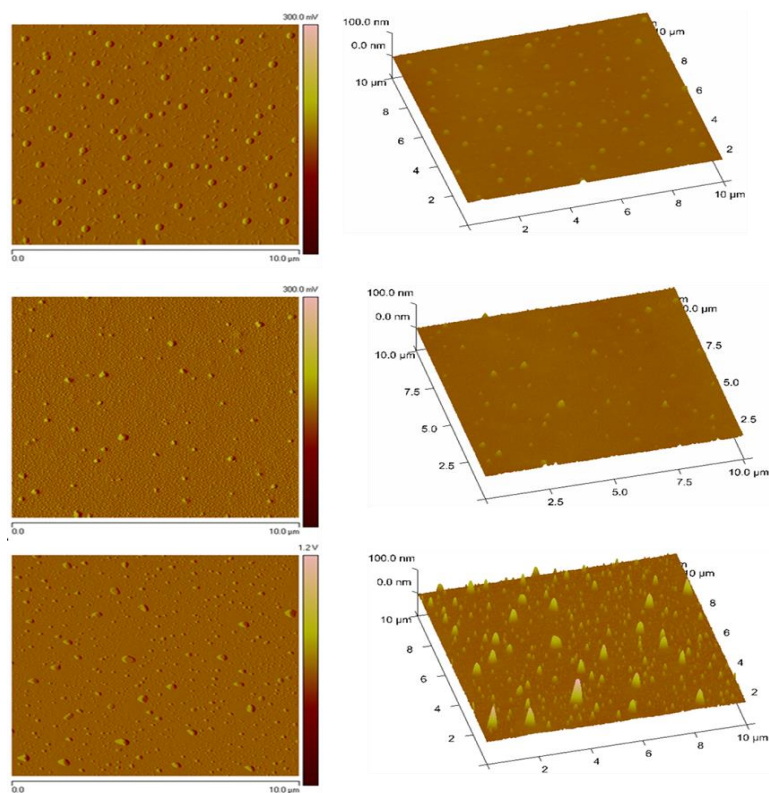
Както се очаква, наблюдаваните морфологични промени рефлектират върху стойностите на R_a (фиг. 12). Грапавостта на пробите се увеличава с повишаване на концентрацията на сребърни наночастици и освен по площ частиците се различават и по височина, която варира между 40 и 120 nm. Същата тенденция за агломерация на наночастици в хибридите е описана в предишно наше проучване, при което повърхността на материалите е изследвана чрез SEM-анализ [Angelova et al., 2012].

Направеният AFM-анализ на SiO₂/HPMC хибридни материали с включено сребро показва сходна повърхностна топография като тази на предишния материал (фиг. 10). Хибриден SiO₂/HPMC/0.5% Ag обаче показва много по-гладка повърхност. С повишаване на сребърното съдържание наблюдаваните структури стават по-високи (16-28 nm) с диаметър, вариращ между 200 и 400 nm. Подобна тенденция е наблюдавана и при SEM анализ от предишни изследвания [Angelova et al., 2014]. Това показва, че увеличаването на концентрацията на сребро провокира формирането на клъстери.



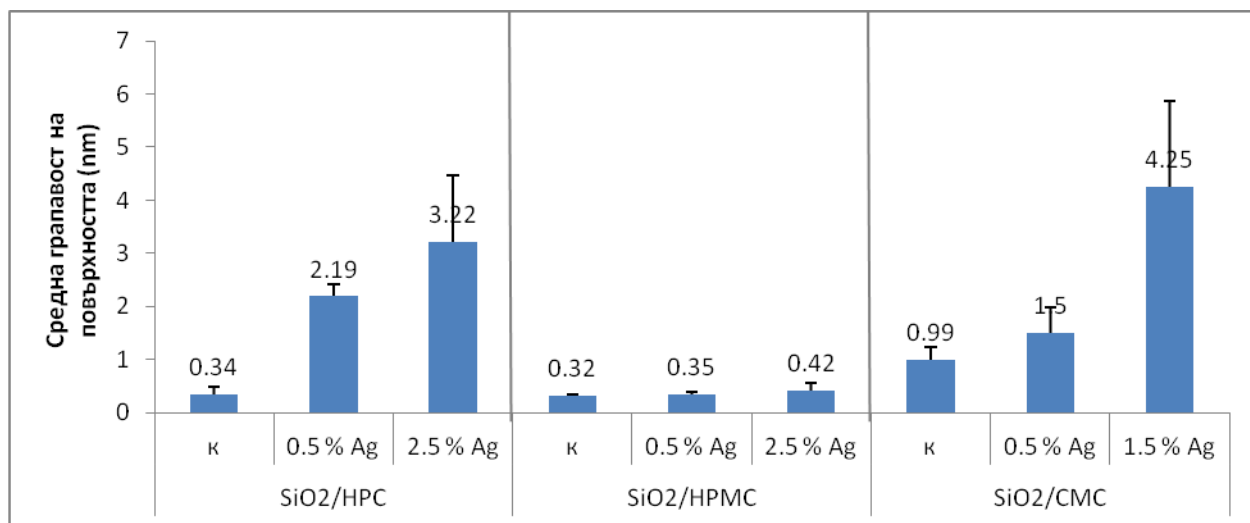
Фиг. 10 AFM изображения на: SiO₂/HPMC-първи ред; SiO₂/HPMC/0.5% Ag-втори ред; SiO₂/HPMC/2.5% Ag хибридни материали-трети ред. Вляво – 2D изображения, вдясно – 3D изображения

Проучена е повърхностната топография и на SiO₂/CMC хибриден материал, представена на фиг. 11. Контролната проба се характеризира с равномерно разпределение на малки кръгли частици със сходни размери (диаметър 250-300 nm, височина 10-16 nm). Прибавянето на 0.5 % сребро води до значителна редукция в броя на частиците. Те стават по-високи (16-28 nm) с хетерогенен размер, вариращ между 200 и 400 nm. Увеличаването на процентното съдържание на сребро до 1.5 % води до формиране на многобройни значително по-големи частици с размер между 16 и 125 nm.



Фиг. 11 AFM изображения на: SiO_2/CMC – първи ред; $\text{SiO}_2/\text{CMC}/0.5\% \text{ Ag}$ – втори ред; $\text{SiO}_2/\text{CMC}/1.5\% \text{ Ag}$ хибридни материали – трети ред. Вляво – 2D изображения, вдясно – 3D изображения

От AFM-изображенията са определени стойностите на средната квадратична грапавост (R_a) на повърхността на всеки един материал.



Фиг. 12 Средна грапавост на повърхността на SiO_2/HPC , SiO_2/HPMC и SiO_2/CMC хибридни материали

Както е показано на фиг. 12, средната грапавост на контролните проби SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC е почти еднаква. Прибавянето на сребро води до съществени промени в морфологията на хибридните материали SiO₂/HPC и SiO₂/CMC и почти незначителни при SiO₂/HPMC. Стойностите на Ra при SiO₂/HPC/0.5 % Ag и SiO₂/HPC/2.5 % Ag са съответно 7 и 10 пъти по-големи в сравнение с контролата SiO₂/HPC при сканиране на идентична площ от 10×10 μm². Подобна тенденция се наблюдава и при SiO₂/CMC хибриден материал, където увеличаването на концентрацията на сребърни наночастици води до повишаване на средната грапавост на повърхността.

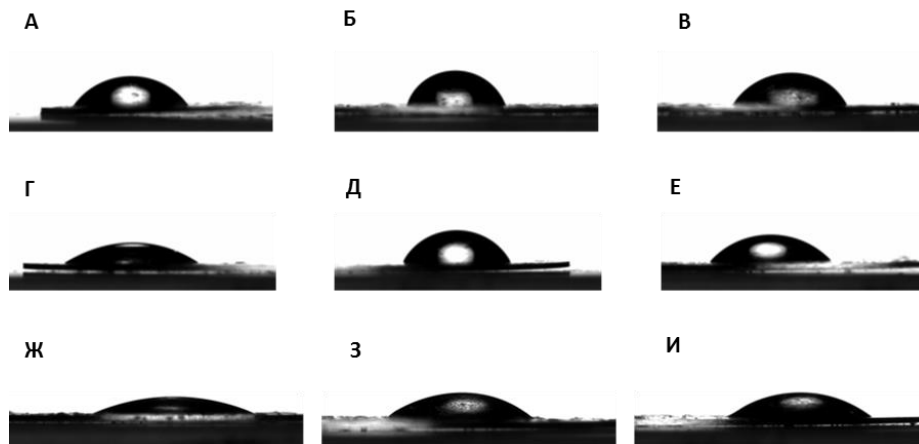
Повърхността на хибридните материали е характеризирана също чрез измерване на контактния ъгъл (Θ), на равновесна водна капка и резултатите са обобщени в табл. 1.

Таблица 1 Среден контактен ъгъл (градуси) на SiO₂/HPC, SiO₂/HPMC и SiO₂/CMC хибридни материали

	SiO ₂ /HPC	SiO ₂ /HPMC	SiO ₂ /CMC
Контрола	54.9 (±0.9)	30.7 (± 0.4)	22.2 (±2.8)
0.5 % Ag	67.5 (±1.8)	62.1 (±0.6)	39.3 (±2.3)
1.5 % Ag	-	-	39.8 (±1.6)
2.5 % Ag	55.3 (±2.0)	47.3 (±0.2)	-

(± стандартно отклонение)

Този анализ е необходим за установяване на хидрофобните/хидрофилните свойства на материалите. Хидрофобността на материалите е от съществено значение за адхезията на клетки върху тях, като човешките клетки предпочитат хидрофилните повърхности, докато белтъците имат афинитет към хидрофобните. Наблюдава се обратно пропорционална връзка между хидрофилността на биоматериалите и контактния ъгъл на водна капка, т.е. при висока хидрофилност на материала се наблюдава нисък контактен ъгъл, както и пропорционална връзка с клетъчното закрепване, т.е. колкото по-висока е хидрофилността, толкова по-голяма е клетъчната адхезия [van Wachem et al., 1987]. Съгласно класификацията на Vogler (1998), биоматериали с контактен ъгъл по-голям от 65° се класифицират като хидрофобни, а тези с по-малък от 65° като хидрофилни. Типичната форма на равновесна водна капка, формирана върху всеки един от изследваните материали, е представена на фиг. 13.



Фиг. 13 Равновесна водна капка, формирана върху А) SiO_2/HPC ; Б) $\text{SiO}_2/\text{HPC}/0.5\% \text{ Ag}$; В) $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$; Г) SiO_2/HPMC ; Д) $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/0.5\% \text{ Ag}$; Е) $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\% \text{ Ag}$; Ж) SiO_2/CMC ; З) $\text{SiO}_2/\text{CMC}/0.5\% \text{ Ag}$; И) $\text{SiO}_2/\text{CMC}/1.5\% \text{ Ag}$ хибридни материали

Експерименталните резултати показват, че и трите материала са хидрофилни и биха могли да служат като субстрат за клетъчно адхезиране. Анализирайки получените данни, се установява, че най-силно изразен хидрофилен характер притежава SiO_2/CMC хибриден материал, следван от SiO_2/HPMC . Забелязва се, че хидрофилността на хибридните материали със сребро намалява в сравнение с контролата. Прибавянето на 0.5 % Ag повишава значително контактния воден ъгъл, като този ефект е много по-силно изразен при SiO_2/HPMC и SiO_2/HPC , където ъгълът нараства почти два пъти и при SiO_2/HPC приближава граничната стойност за класифициране на материалите като хидрофобни. Прибавянето на 2.5 % Ag оказва по-слабо въздействие върху измерените стойности на контактния ъгъл. Хидрофобната природа на $\text{SiO}_2/\text{HPC}/0.5\% \text{ Ag}$ и $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/0.5\% \text{ Ag}$ се дължи най-вече на съдържанието на AgNps, което води до модификация в ориентацията на повърхностните хидроксилни групи по такъв начин, че по-малък брой Н-свързачи позиции са изложени към водната фаза и са способни да взаимодействат с нея. Предполага се, че с увеличаване на сребърното съдържание повърхността на материала се насища със AgNps и някои от тях остават несвързани. Освен това, освобождаването на сребърни йони също не е изключено.

От направените структурни изследвания на синтезираните хибридни материали се потвърждава уплътняването на структурата на синтезираните хибридни материали с увеличаване количеството сребро. Въз основа на тези резултати се предполага, че с

вариране състава на даден хибрид е възможно създаването на различни полифункционални материали, които биха намерили различно практическо приложение.

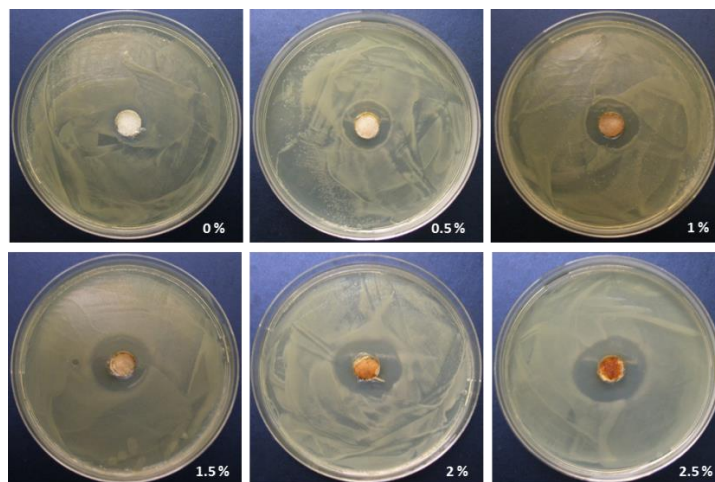
3. Изследване ефекта на хибридните материали спрямо прокариотни микроорганизми

Синтезираните хибридни материали на основата на различни целулозни производни с включени сребърни наночастици бяха тествани за антибактериална активност срещу *Escherichia coli* K12 (тест-култура за Грам-отрицателни бактерии) и *Bacillus subtilis* 3562 (тест-култура за Грам-положителни бактерии).

Отчитане на инхибиторни зони спрямо Escherichia coli K12 чрез агар-дифузионен метод

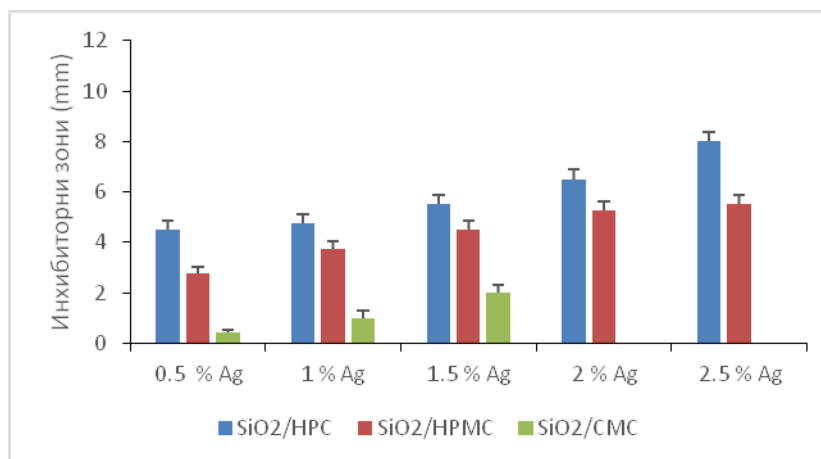
Хибридните материали се поставят върху агарова среда с посята култура, както е описано в раздела материали и методи. След 24 часа култивиране на изследвания щам около ямките с хибридни мататериали се появяват инхибиторни зони, лишени от микробен растеж.

На фиг. 14 са представени резултатите от микробиологичния тест при използване на тест-култура *E. coli* K12, а резултатите от осреднените стойности са обобщени във фиг. 15.



Фиг. 14 Инхибиторни зони на SiO_2/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *E. coli* K12 след 24 часа инкубиране

При изследване ефекта на SiO_2/HPC хибриден материал най-малка зона се наблюдава при 0.5 % сребро – 4.5 mm, а най-голяма при 2.5 % сребро – 8 mm.



Фиг. 15 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро спрямо *E. coli* K12

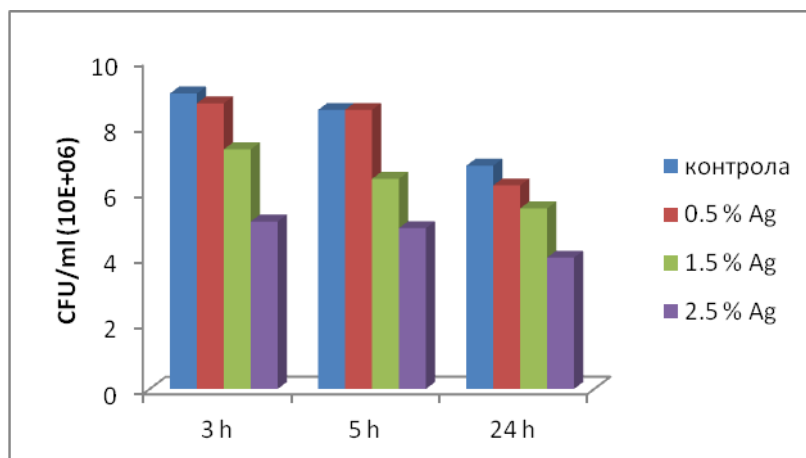
Направената сравнителна характеристика за размера на инхибиторните зони при различните материали (фиг. 15) разкрива плавното им нарастване и при трите изследвани хибрида с увеличаване на количеството сребро в материалите. SiO₂/HPC хибриден материал показва по-силно изразени зони в сравнение с SiO₂/HPMC материал. Отново третият SiO₂/CMC материал проявява най-слабо изразено въздействие върху растежа на *E. coli* K12. Подобни изследвания са проведени и от Tatar et al. (2007), които синтезират по зол-гелния метод неорганично/органични антибактериални прозрачни филми, съдържащи две силанови производни, ацетатен комплекс и сребърни йони. Те установяват, че хибридни покрития дори с 1 % сребро проявяват антибактериални свойства срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Отчитане на CFU и изчисляване клетъчно инхибиране (%) на Escherichia coli K12 след контакт с изследваните хибридни материали.

Вторият метод, който беше използван за определяне антибактериалната активност на изследваните хибридни материали, е свързан с проследяване броя единични колонии върху петрито и изчисляване клетъчно инхибиране при култивиране на изследвания щам в присъствие на материалите с различно съдържание на сребро.

При изследване антибактериалното поведение на втория SiO₂/HPMC хибриден материал (фиг. 16) се наблюдава подобна тенденция, както при първия материал SiO₂/HPC. Контролата и най-ниската сребърна концентрация предизвикват прорастването на сходен брой колонии на 3-ти, 5-ти и 24-ти час. Материалите, съдържащи 1.5 % и 2.5 %

сребро, инхибират в по-голяма степен, като най-ясно това е изразено на 24-тия час при по-високото съдържание на сребро.



Фиг. 16 Ефект на SiO_2/HPMC хибриден материал с различно процентно съдържание сребро върху жизнеността на *E. coli* K12

С цел обобщаване резултатите от проведения експеримент в табл. 2 са нанесени данните от изчисленото клетъчно инхибиране (%) на *E. coli* K12.

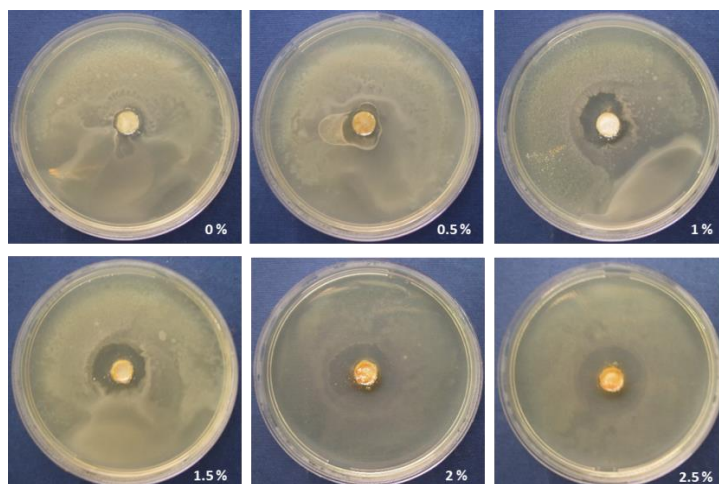
Таблица 2 Инхибиране броя клетки *E. coli* K12 (%) след 24 часа култивиране в присъствие на хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро

	SiO_2/HPC	SiO_2/HPMC	SiO_2/CMC
0.5 % Ag	40	38	26
1.5 % Ag	58	45	28
2.5 % Ag	61	60	-

Наблюдава се правопрпорционално нарастване на клетъчното инхибиране с увеличаване на процентното съдържание сребро, като SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали проявяват почти еднакво инхибиращо действие, а SiO_2/CMC хибриден материал показва най-ниски стойности на редукция.

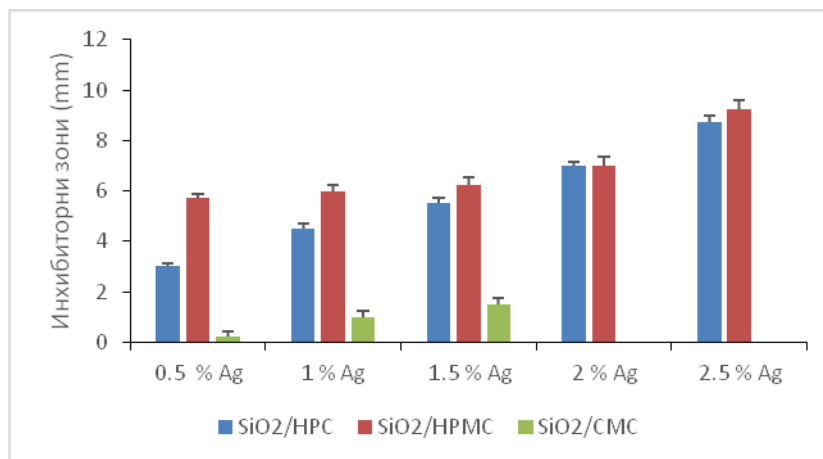
Отчитане на инхибиторни зони спрямо *Bacillus subtilis* 3562 чрез използване на агар-дифузионен метод

При изследване поведението на Грам-положителни микроорганизми – *Bacillus subtilis* 3562 се установява подобна зависимост на големината на зоните от количеството вложени сребърни наночастици, както при *Escherichia coli* K12.



Фиг. 17 Инхибиторни зони на SiO_2/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *B. subtilis* 3562 след 24 часа инкубиране

От фиг. 17 може да се направи извод, че SiO_2/HPC хибриден материал, съдържащ 0.5 % Ag, предизвиква най-малка инхибиторна зона от 3 mm спрямо *Bacillus subtilis* 3562, чиято големина нараства правопрпорционално с увеличаване процентното съдържание на сребро. В най-силна степен изследваният щам се инхибира в присъствие на 2.5 % Ag и показва зона от 8.75 mm.



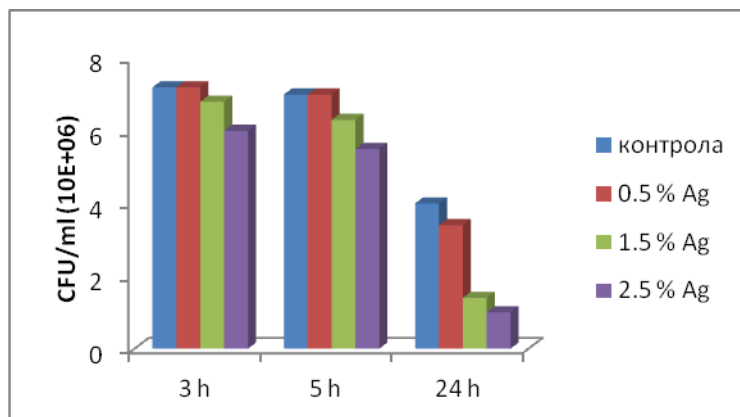
Фиг. 18 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро, спрямо *B. subtilis* 3562

На фиг. 18 е показана съпоставка, направена за големината на инхибиторните зони при тестване на хибридните материали с различни целулозни производни спрямо *Bacillus subtilis* 3562. Наблюдава се тенденция в нарастване на зоните с увеличаване концентрацията на вложеното количество сребро. При SiO_2/HPC хибриден материал се наблюдава плавно нарастване на зоните с повишаване на сребърната концентрация,

докато при SiO₂/HPMC размерът на зоните при началните концентрации сребро почти не се променя, след което се забелязва скок при 2.5 % сребро. При сравнение на SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC хибридни материали по-добро антибактериално поведение показва вторият материал при най-ниските сребърни концентрации, след което ефектът, който оказват материалите, е почти еднакъв при 2 % и 2.5 % сребро. Хибридният материал SiO₂/HPMC/Ag има ефективно антибактериално действие при всички изследвани сребърни концентрации, докато хибриден материал SiO₂/HPC/Ag при ниските сребърни концентрации има по-слабо действие и неговата ефективност е по-добра във високите сребърни концентрации. От друга страна третият SiO₂/CMC хибриден материал инхибира в незначителна степен изследвания щам и води до образуване на най-малки по размер зони. Изразените антибактериални свойства на изследваните хибридни материали вероятно се дължат не само на включените в тях AgNps, които са потвърдени при структурното охарактеризиране на хибридите, но и на отделящите се Ag⁺ при контакт с течна фаза. Вероятно те са причина за образуването на инхибиторни зони при дифундирането им в агара и потискане растежа на микроорганизмите. При подобни изследвания авторите Kumar & Münstedt, (2005) също смятат, че бактерицидният ефект на съдържащите сребро полимери се основава на освобождаване на сребърни йони при взаимодействие с течна водна фаза.

Отчитане на CFU и изчисляване клетъчното инхибиране (%) на Bacillus subtilis 3562 след контакт с изследваните хибридни материали

Вторият SiO₂/HPMC хибриден материал не проявява силно инхибиращ ефект в началните часове на контакт между щамата и пробите (фиг. 19).



Фиг. 19 Ефект на SiO₂/HPMC хибриден материал с различно процентно съдържание сребро върху жизнеността на B. subtilis 3562

Дори най-високата сребърна концентрация 2.5 % води до появата на приблизително 6×10^6 CFU/ml на 3-тия и 5-тия час. Най-високо редуциране на броя колонии се наблюдава на 24-тия час, като най-ниски стойности показват проби с 1.5 % и 2.5 % Ag – около 1×10^6 CFU/ml, което може да бъде отнесено към по-високата концентрация на сребро и отсъстващ източник на хранителни вещества.

Таблица 3 разкрива сравнение в процента инхибиране на клетките *B. subtilis* 3562 след 24 часа култивиране в присъствие на изследваните хибридни материали. Сходни стойности на редукция се наблюдават при SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC хибридни материали, които се повишават при по-висока концентрация на сребро. Третият SiO₂/CMC хибриден материал показва по-слабо изразена редукция, сравнена с другите два.

Таблица 3 Инхибиране броя клетки *B. subtilis* 3562 (%) след 24 часа култивиране в присъствие на хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро

	SiO ₂ /HPC	SiO ₂ /HPMC	SiO ₂ /CMC
0.5 % Ag	55	66	45
1.5 % Ag	80	86	54
2.5 % Ag	85	90	-

От проведените експерименти, свързани с изследване антибактериалното действие на хибридните материали спрямо *E. coli* K12 и *B. subtilis* 3562, става ясно, че по-висок процент инхибиране на клетките и при трите изследвани хибридни материала се наблюдава спрямо *B. subtilis* 3562. При измерване на инхибиторните зони спрямо двата щама SiO₂/HPC и SiO₂/CMC хибридни материали водят до образуване на почти еднакви по размер зони, но SiO₂/HPMC хибриден материал проявява по-силно инхибиращо действие спрямо *B. subtilis* 3562. Резултатите от двата метода показват по-силно изразена чувствителност на тест културата за Грам-положителни бактерии *B. subtilis* 3562 спрямо тест културата за Грам-отрицателни бактерии *E. coli* K12. Група учени установяват по-силно изразени инхибиторни зони спрямо *B. subtilis* в сравнение с *E. coli* при изследване антимикуробните свойства на метил целулоза/сребро съдържащи нанокompозити [Maity et al., 2012]. До подобни изводи стигат и Bryaskova et. al. (2010), които изследват поведението на PVA/TEOS/Ag-Np хибриди спрямо *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* и *E. coli* и установяват по-силно изразена антибактериална активност спрямо Грам-положителните бактерии. Това те отдават на разлика в клетъчната структура на Грам-

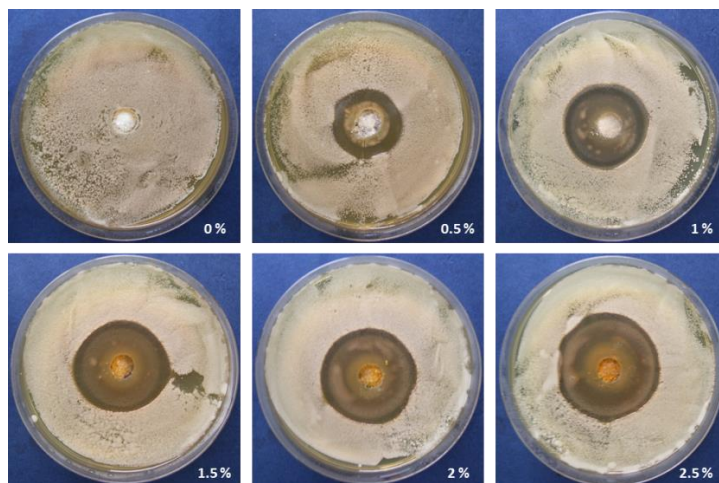
положителните и Грам-отрицателните бактерии. Клетъчната стена на Грам-отрицателните бактерии се състои от липиди, протеини и LPS, които осигуряват по-ефективна защита срещу биоциди в сравнение с Грам-положителните бактерии, където клетъчната стена не притежава външна мембрана от LPS [Maneerung et al., 2008; Feng et al., 2000].

4. Изследване ефекта на хибридни материали спрямо еукариотни микроорганизми

Синтезираните хибридни материали на основата на различни целулозни производни с включени сребърни наночастици бяха тествани за антимикробна активност срещу два щама дрожди – *Saccharomyces cerevisiae* 537 и *Candida albicans* 74 и два щама плесени – *Aspergillus niger* 371 и *Penicillium chrysogenum* 2303.

Отчитане на инхибиторни зони спрямо *Saccharomyces cerevisiae* 537 чрез агар-дифузионен метод

На фиг. 20 са представени резултатите от микробиологичния тест при използване на тест-култура *Saccharomyces cerevisiae* 537. След проведеното култивиране бяха отчетени зоните на инхибиране за всяка една от четирите различни страни на пробите.

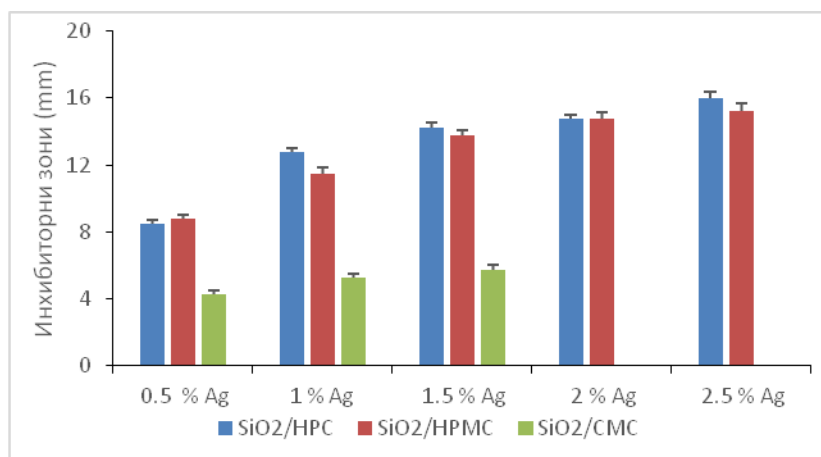


*Фиг. 20 Инхибиторни зони на SiO₂/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *S. cerevisiae* 537 след 24 часа инкубиране*

От фиг. 20 се вижда конfluентен растеж на щама при всички изследвани SiO₂/HPC хибридни материали и ясно изразени инхибиторни зони при всички сребърни концентрации с тенденция към нарастване с увеличаване на вложеното сребро. Размерът на зоната при 0.5 % сребро е 8.5 mm, а при 2.5 % - 16 mm, което показва около 2 пъти нарастване на зоната.

От ръба на ямката с поставения материал встрани се образува зона на пълна задръжка на растежа, която вероятно се дължи на дифузия на антимикробния агент в агара, след което се наблюдава пръстен на непълна задръжка, последван от равномерен растеж на дрождевата култура. Микроскопски препарати с проби и от двата пръстена не показват наличие на клетки.

За обобщаване размера на зоните при различните материали е направена сравнителна графика, представена на фиг. 21.



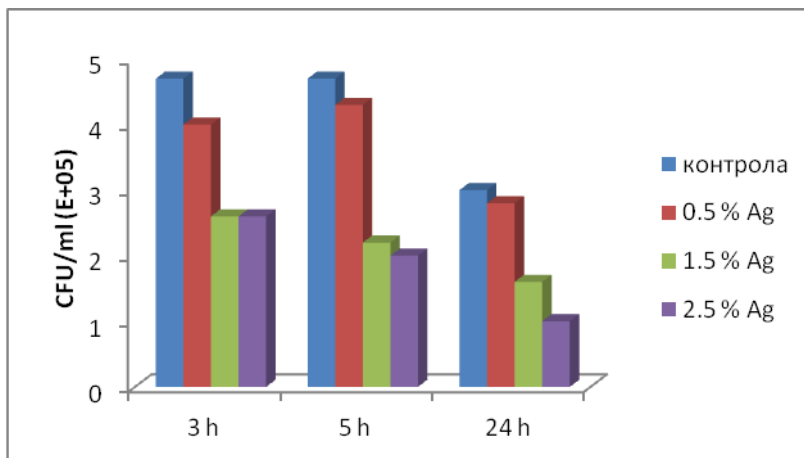
Фиг. 21 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро, спрямо *S. cerevisiae* 537

Прави впечатление, че първите два хибридни материала имат сходно поведение по отношение потискане растежа на *S. cerevisiae* 537 и показват почти еднакви по размер инхибиторни зони. Третият SiO₂/CMC материал, както и при бактериалните щамове, води до по-слабо потискане на изследвания щам.

Отчитане на CFU и изчисляване клетъчното инхибиране (%) на *Saccharomyces cerevisiae* 537 след контакт с изследваните хибридни материали

Антимикробният ефект на SiO₂/HPC хибриден материал е изследван и чрез проследяване CFU/ml спрямо времето при различните сребърни концентрации (фиг. 22). Изходното количество вложена дрожева култура за всички хибридни материали е с концентрация 5×10^5 CFU/ml *S. cerevisiae* 537. И трите хибридни материала без сребро не оказват промяна в броя на клетките сравнено с контролата и поради тази причина те не са отбелязани на съответните графики (фиг. 22). На 3-тия и 5-тия час от култивирането на пробите и материала се забелязват сходни стойности на CFU/ml между контролата и

пробата с 0.5 % Ag, както и между пробите с 1.5 % и 2.5 % Ag. Това показва, че най-ниската сребърна концентрация (0.5 %) почти не повлиява растежа на културата, докато другите две концентрации инхибират щама в почти еднаква степен. На 24-тия час от култивирането обаче се забелязва съществен спад в CFU/ml, което може да се дължи на повече освободено сребро в течната фаза.



Фиг. 22 Ефект на SiO_2/HPC хибриден материал с различно процентно съдържание сребро върху жизнеността на *S. cerevisiae* 537

От резултатите, получени за трите материала (табл. 4), може да се обобщи, че степента на инхибиране на тестваните микроорганизми е в пряка зависимост от концентрацията на сребърни наночастици, както и от времето за контакт между тях.

Таблица 4 Инхибиране броя клетки *S. cerevisiae* 537 (%) след 24 часа култивиране в присъствие на хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро

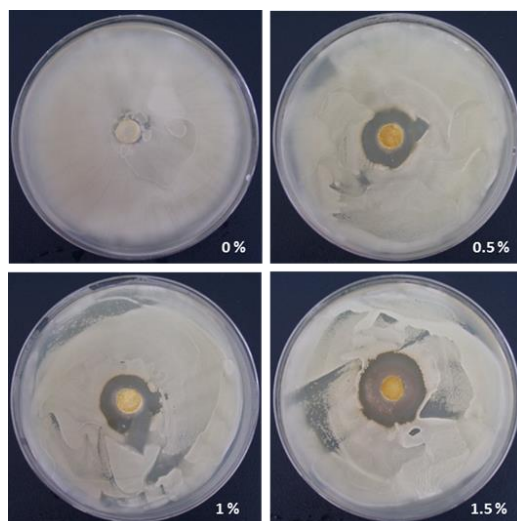
	SiO_2/HPC	SiO_2/HPMC	SiO_2/CMC
0.5 % Ag	44	54	20
1.5 % Ag	68	76	28
2.5 % Ag	80	92	-

Най-висок процент инхибиране е изчислен при $\text{SiO}_2/\text{HPC}/ 2.5 \% \text{ Ag}$ и $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5 \% \text{ Ag}$ хибридни материали, съответно 80 % и 90 %, а най-нисък процент при $\text{SiO}_2/\text{CMC}/0.5 \%$ хибриден материал – 20 %.

Отчитане на инхибиторни зони спрямо *Candida albicans* 74 чрез използване на агар-дифузионен метод

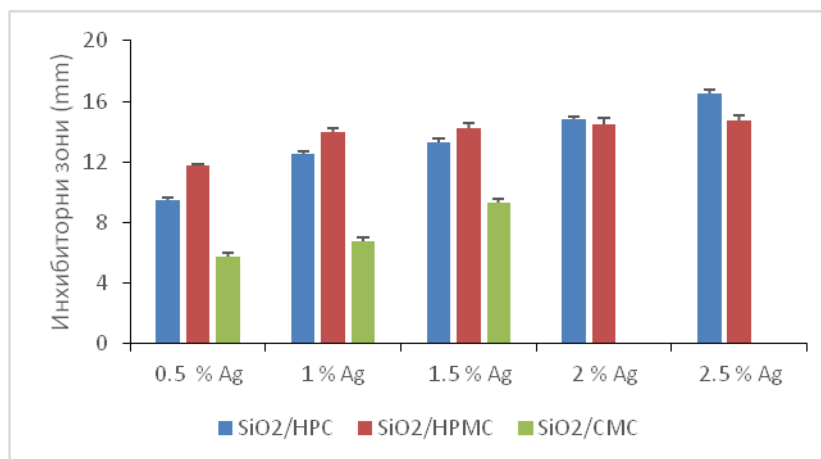
Вторият щам, върху който беше фокусирано изследването на антимикробните свойства на хибридните материали с различни целулозни производни, беше *Candida albicans* 74.

От фиг. 23 се вижда, че измерените инхибиторни зони спрямо SiO_2/CMC хибриден материал са значително по-малки, отколкото зоните при другите два материала. Минималната изследвана концентрация сребро води до образуване на 5.75 mm стерилна зона, която е почти два пъти по-малка в сравнение със зоните при другите два материала, получени при същите концентрации сребро. Най-голяма зона (9.25 mm) се забелязва при хибриден материал, съдържащ 1.5 % сребро, която се явява около 1,5 пъти по-малка отново сравнен с аналогична концентрация сребро при другите два хибридни материала.



Фиг. 23 Инхибиторни зони на SiO_2/CMC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *C. albicans* 74 след 24 часа инкубиране

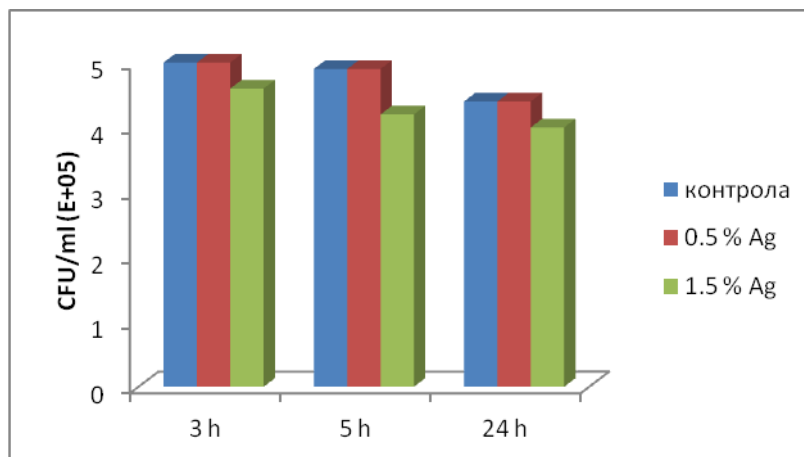
От посочените графични данни (фиг. 24) и илюстративни материали се забелязва, че SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали водят до образуване на сходни по големина инхибиторни зони и имат по-добър антимикробен ефект срещу *C. albicans* 74 в сравнение с SiO_2/CMC , дължащо се вероятно на по-доброто освобождаване и дифундиране в агара на включеното сребро.



Фиг. 24 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро, спрямо *C. albicans* 74

Отчитане на CFU и изчисляване клетъчното инхибиране (%) на *Candida albicans* 74 след контакт с изследваните хибридни материали

Изходното количество вложена дрожева култура за всички хибридни материали е с концентрация 5×10^5 CFU/ml *C. albicans* 74. И трите хибридни материала без сребро не оказват промяна в броя на клетките сравнено с контролата и поради тази причина те не са отбелязани на графиките (фиг. 25).



Фиг. 25 Ефект на SiO₂/CMC хибриден материал с различно процентно съдържание сребро върху жизнеността на *C. albicans* 74

На фиг. 25 са показани данни за CFU/ml, получени при третиране на културата с третия SiO₂/CMC хибриден материал. Както и при *S. cerevisiae* 537, и в този случай не се наблюдава силна редукция на броя CFU/ml дори при 24 часа, което може да бъде обяснено с вероятно по-трудното освобождаване на среброто от материала.

Аналогична съпоставка на инхибирането броя клетки (%) между трите материала при *C. albicans* 74 може да бъде направена както при останалите тествани щамове (табл. 5). Най-силно изразена редукция се забелязва при SiO₂/HPC/2.5 % Ag, а най-слабо изразена при SiO₂/CMC/0.5 % Ag.

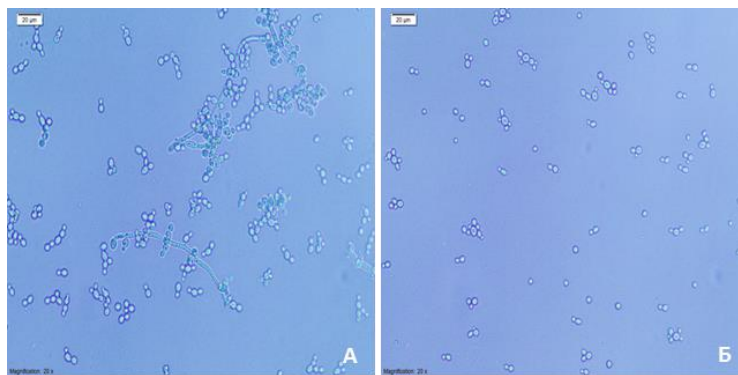
Таблица 5 Инхибиране броя клетки C. albicans 74 (%) след 24 часа култивиране в присъствие на хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро

	SiO ₂ /HPC	SiO ₂ /HPMC	SiO ₂ /CMC
0.5 % Ag	46	42	12
1.5 % Ag	60	50	20
2.5 % Ag	88	64	-

Изследвания на морфологичния диморфизъм на C. albicans 74

Друга задача, която бе поставена, е изследване морфологичния диморфизъм при изследвания щам *C. albicans* 74 в присъствие на хибридните материали с различно съдържание на сребро.

Морфологията на *C. albicans* 74 силно се повлиява от температурата, рН или наличието на серум. Диморфизмният преход на тези клетки от дрождева форма във форма мицел е характерно за патогенната форма на *C. albicans* [Berman & Sudbery, 2002; Nasution, 2013]. Също бе изследвана проявата на този ефект при *C. albicans* 74 в присъствие на хибридните материали при култивиране на клетките при 37 °C за 48 часа. Фиг. 26 представя мицелната форма при *C. albicans* 74 (фиг. 26 А), характерна за патогенната форма при тази температура, и дрождевата форма (фиг. 26 Б), където мицеларната форма е силно инхибирана в присъствие на изследваните хибридни материали, съдържащи сребро. Тези наши резултати са потвърждение и на резултатите, получени от Kim K. Et al. (2009), които също наблюдават морфологичен диморфизъм при *C. albicans* 74, култивиран в присъствие на AgNps.



Фиг. 26 Ефект на сребърните наночастици върху морфологичния диморфизъм при *C. albicans* 74. (А) Контрола – мицеларна форма, (Б) клетки, култивирани в присъствие на $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$ хибридни материали. Увеличение 400х

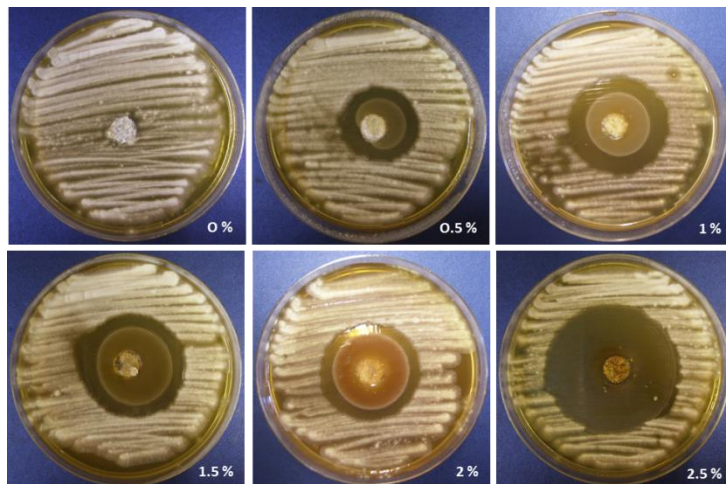
При обобщаване на резултатите, получени при изследване антимикробния ефект на хибридните материали спрямо двата щам дрождеви култури, става ясно, че измерените стойностите на инхибиторните зони са сходни и не може да се определи категорично кой от щамовете проявява по-силна чувствителност. При анализиране резултатите от CFU/ml обаче се забелязва по-силно изразена редукция в броя на клетките *S. cerevisiae* 537 при SiO_2/HPMC и SiO_2/CMC хибридни материали. Това би могло да определи щам *S. cerevisiae* 537 като една степен по-чувствителен в сравнение с *C. albicans* 74.

Отчитане на инхибиторни зони спрямо *Aspergillus niger* 371 чрез използване на агар-дифузионен метод

Друга част от изследванията, свързани с антигъбния ефект на хибридните материали, е фокусирана върху действието им спрямо *Aspergillus niger* 371.

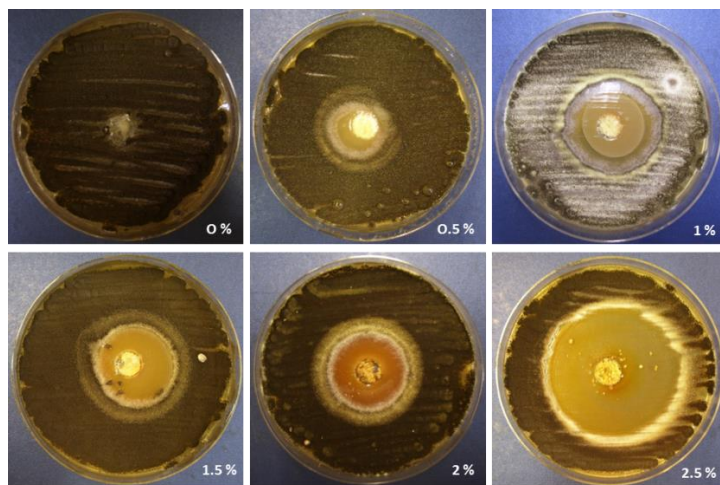
На фиг. 27 са представени инхибиторните зони, образувани под въздействието на SiO_2/HPC хибриден материал след 24 часа култивиране на тествания щам плесени. Най-малка измерена зона е описана при 0.5 % сребро – 10 mm, след което се наблюдава закономерност в нарастване на зоните с увеличаване на сребърната концентрация и достигане на най-голяма зона от 21.5 mm при 2.5 % сребро. При отчитане на резултатите се отличава формиране на две концентрични окръжности с център изследваната проба. Те представляват зони, лишени от микробен растеж, но различаващи се по цвят. Появата на две зони би могло да се обясни с това, че във вътрешната зона дифузията на антимикробния агент е най-силна и там концентрацията на сребърни йони е най-висока, докато във външната зона постепенно тя намалява. Тези резултати създадоха

предпоставка да се провери до каква степен двете зони се запазват след по-дълъг период на култивиране.



Фиг. 27 Инхибиторни зони на SiO_2/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *A. niger* 371 след 24 часа инкубиране

Както се забелязва от фиг. 28, спорите потъмняват вследствие на продължителното култивиране, но зоните се запазват сравнително ясно открити. Въпреки това по външния зонов ръб се забелязва прорастване на плесените, което води до намаляване размера на инхибиторните зони.

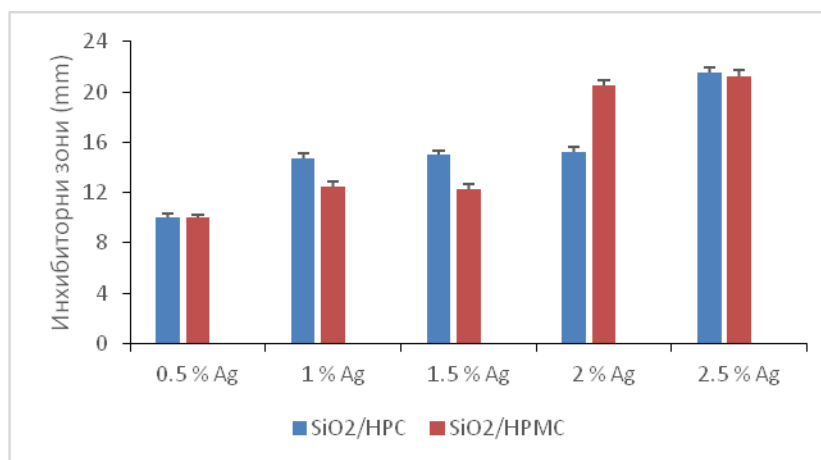


Фиг. 28 Инхибиторни зони на SiO_2/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *A. niger* 371 след 72 часа инкубиране

Вследствие на настъпилото спорулиране между ясно изразената зона и същинския растеж се наблюдава тясна граничната зона с плесени в по-светъл цвят. Особено ясно изразено е това при петрито с проба, съдържаща 2 % сребро. Това би могло да се обясни с

факта, че хибридният материал потиска растежа на плесените в първоначалните етапи на култивиране, след което продължителното култивиране води до невъзможност на материалите да окажат пълно инхибиране на щама и постепенно той започва да прораста дори в зоната, лишена в началото от растеж. Наблюдава се фунгистатичен ефект.

Направеното сравнение между размера на зоните при трите материала (фиг. 29) показва, че само първите два оказват инхибиращо действие, докато последният не повлиява в никаква степен растежа на плесените и поради тази причина на графиката не са отбелязани стълбчета, отразяващи размера на инхибиторните зони.

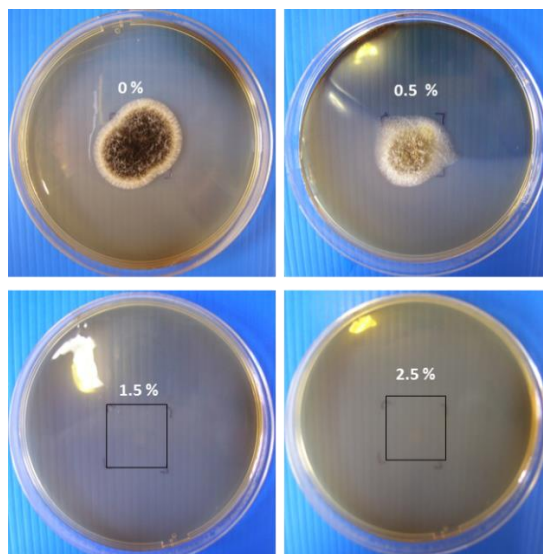


Фиг. 29 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро, спрямо *A. niger* 371

Измерените инхибиторни зони при аналогични концентрации сребро на SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC хибридни материали са сходни, като при 0.5 % и 2.5 % сребро са почти еднакви. В този случай би било трудно да се определи кой от двата материала има по-добро антимикробно действие спрямо тествания щам.

Определяне антигъбното действие на хибридният материал посредством контакт между *Aspergillus niger* 371 и изследваните проби

Използван е нов метод за проследяване антигъбната активност на хибридният материал с включени сребърни наночастици чрез отчитане способността на хибридите, отляти и изсушени върху покривни стъкла, изцяло да потиснат растежа на плесените. Бяха проведени и експерименти за проследяване поведението на еукариотни клетки *A. niger* 371 (фиг. 30) след третиране с хибридни материали с включени сребърни наночастици.



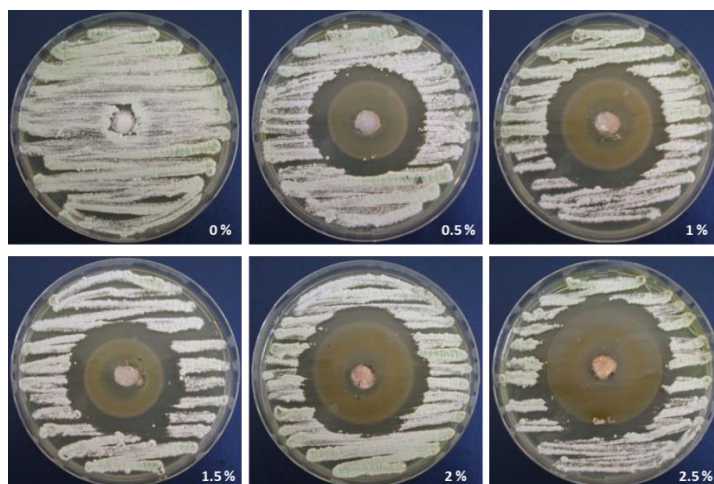
Фиг. 30 Прораснали колонии след третиране с SiO_2/HPC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *A. niger* 371

От фиг. 30 се вижда, че тестваните материали оказват въздействие и върху растежа на изследваните плесени. Растеж се наблюдава само при контролата и при най-ниската концентрация на сребро. Забелязва се значително потъмняване на спорите при петрито с нулево съдържание на сребро, което може да се обясни с липсата на инхибиращо действие от страна на материала и по-бързия растеж на плесента. Хибриден материал $\text{SiO}_2/\text{HPC}/0.5\%$ Ag не успява напълно да потисне растежа на плесента, но сравнено с контролата води до неговото забавяне. Останалите изследвани сребърни концентрации напълно водят до инхибиране на тест-културата и растеж не се наблюдава. В този случай материалите проявяват фунгициден ефект.

Отчитане на инхибиторни зони спрямо *Penicillium chrysogenum* 2303 чрез използване на агар-дифузионен метод

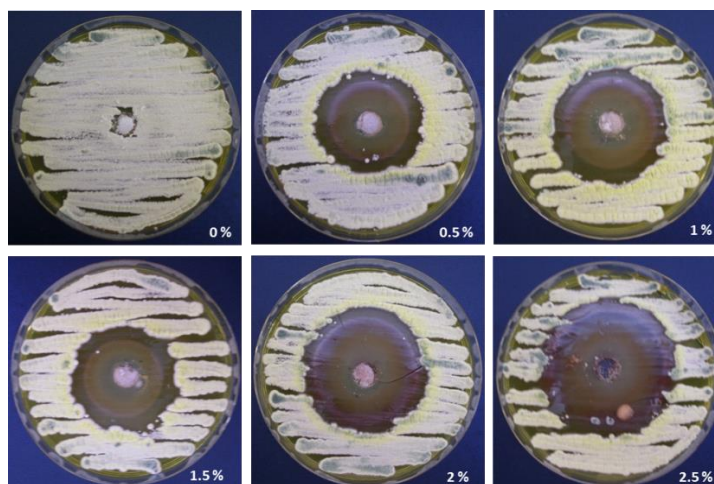
Последният щам, който беше използван при изследване антигъбната активност на хибридните материали, е *Penicillium chrysogenum* 2303.

С увеличаване на сребърното съдържание размерът на инхибиторната зона, свободна от микробен растеж, също се увеличава. В този случай обаче осреднената стойност на най-малката измерена зона е 18.25 mm при 0.5 % сребро, докато при най-високата концентрация от 2.5 % е 22.5 mm. Ясно отчетливи са отново две концентрични области от инхибиторни зони (фиг. 31).



Фиг. 31 Инхибиторни зони на SiO_2/HPMC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *P. chrysogenum* 2303 след 24 часа инкубиране

Аналогично и на другия SiO_2/HPC хибриден материал при този случай също се наблюдава растеж на плесените и на 72-рия час от култивирането (фиг. 32).

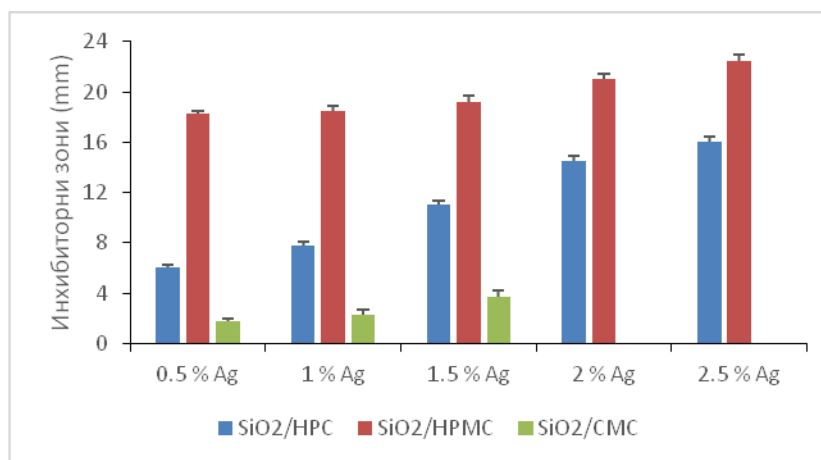


Фиг. 32 Инхибиторни зони на SiO_2/HPMC хибридни материали с различна концентрация на сребро спрямо *P. chrysogenum* 2303 след 72 часа инкубиране

Забелязва се прорастване на плесента във външния пръстен на инхибиторните зони, но то е сравнително слабо изразено в промяна диаметъра на зоната спрямо 24-тия час. Въпреки това се наблюдава частично потъмняване на спорите, дължащо се на продължителното култивиране.

Направената съпоставка между размера на зоните при трите материала разкрива инхибиращото действие само на първите два SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали, докато последният повлиява в много малка степен растежа на плесените.

Забелязва се стъпаловидно нарастване на зоните с повишаване количеството вложено сребро при SiO₂/HPC хибридни материали, докато при SiO₂/HPMC диаметърът на зоните при различните сребърни концентрации почти не се изменя и се запазва сравнително голям. Резултатите, показани от третият SiO₂/CMC хибриден материал, разкриват незначителни зони в сравнение с другите два. Най-силно изразени инхибиторни зони са наблюдавани при SiO₂/HPMC хибриден материал (фиг. 33).



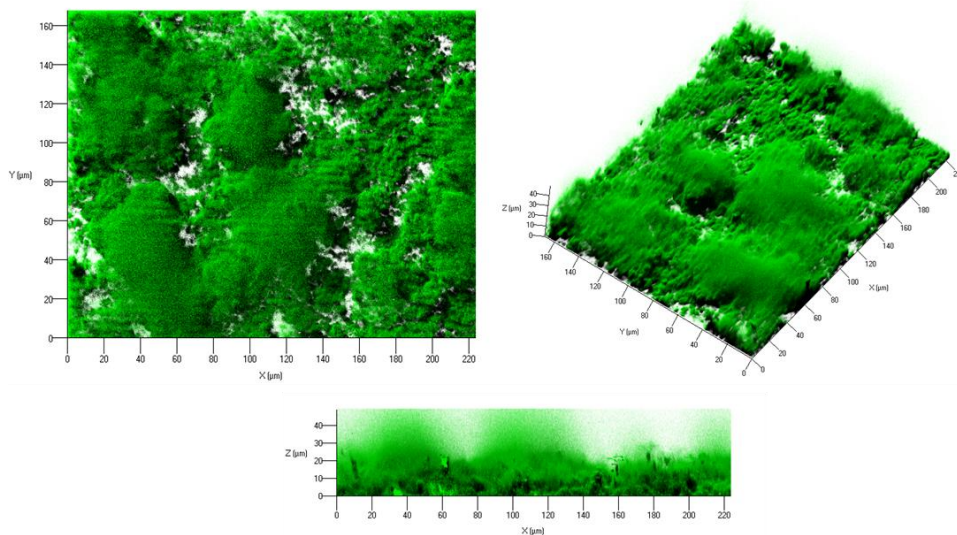
Фиг. 33 Сравнение на инхибиторните зони, получени от хибридни материали с различни целулозни производни и различно процентно съдържание на сребро, спрямо *P. chrysogenum* 2303

Въз основа на проведените изследвания за определяне антигъбния потенциал на тестваните хибридни материали чрез определяне размера на инхибиторните зони срещу плесени е направено следното обобщение. Установява се по-продължително задържане растежа на *P. chrysogenum* 2303 в процеса на култивиране и дори след 144-тия час се наблюдават инхибиторни зони. Резултатите от *A. niger* 371 показват, че материалите не успяват да възпрепятстват растежа на плесента във външния пръстен на инхибиторната зона след 72 часа култивиране. Вследствие на това беше направен изводът, че хибридните материали показват по-силно антигъбно действие спрямо *P. chrysogenum* 2303, отколкото спрямо *A. niger* 371. До подобни резултати стигат и Matei et al. (2015), които изследват антигъбното поведение на биосинтезирани сребърни наночастици спрямо видове от род *Fusarium*, род *Penicillium* и род *Aspergillus*. Използвайки агар-дифузионния метод, те измерват най-големи инхибиторни зони при род *Fusarium*, последван от род *Penicillium* и като най-слабо чувствителен те определят род *Aspergillus*.

При всички изследвани щамове в настоящия дисертационен труд SiO_2/CMC хибриден материал проявява най-слабо изразен антимикробен ефект и всички микроорганизми показват незначителна чувствителност към неговото действие. Останалите два SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материала успяват да повлияят в по-голяма степен растежа на бактериите, дрождите и плесените. Затова следващата част от работата, свързана с проучване възможността на бактериите *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 да формират биофилм върху повърхността на хибридните материали, е фокусирана върху изследвания, касаещи само SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали.

5. Изследване ефекта на хибридните материали по отношение на адхезията и биофилм формирането на щам *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

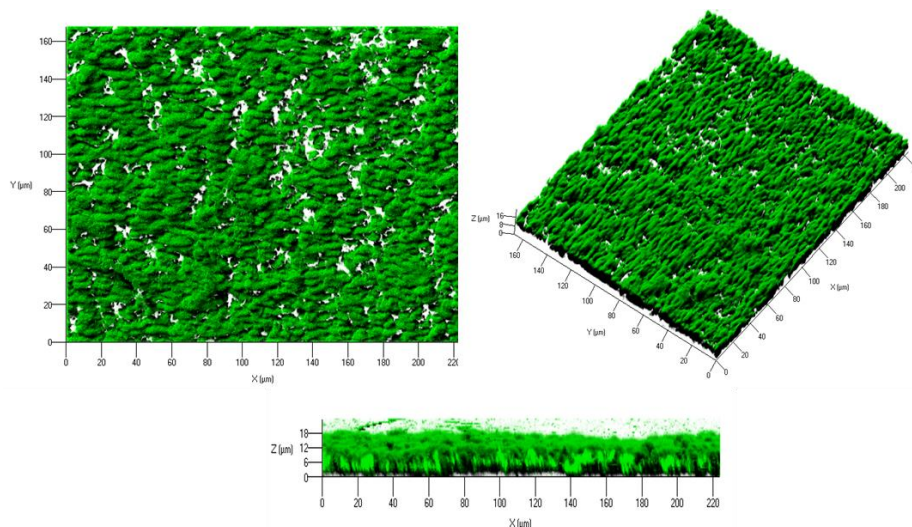
Синтезираните SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали с включени сребърни наночастици бяха тествани при формиране на биофилми от *P. aeruginosa* PAO1. От резултатите се забелязва „разсейване“ в снимките поради гъстота на прорастналите колонии. След 72-часово култивиране на щамата върху контролна проба на SiO_2/HPC материал се наблюдава формиране на слой биофилм със средна дебелина $28\text{ }\mu\text{m}$ (фиг. 34).



Фиг. 34 Флуоресцентни изображения на 72-часови биофилми на *P. aeruginosa* PAO1, формиранни върху SiO_2/HPC материали. Биофилмите са получени в система от двуканална проточна клетка върху покривни стъкла с нанесени хибриди при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и са визуализирани с багрило SYTO. Вляво – изглед отгоре, вдясно – 3D-снимка, долу – страничен изглед.

Проведен е и експеримент за проследяване въздействието на SiO_2/HPC хибриден материал, съдържащ 2.5 % сребро, върху адхезионната способност на *P. aeruginosa* PAO1.

От фиг. 35 се забелязва, че дебелината на биофилма е значително по-малка, около 18 μm , което е доказателство за антимикробния ефект на синтезираните хибридни материали. Редукцията на биофилма върху $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$ хибриден материал е 35.7 % в сравнение с биофилма върху SiO_2/HPC материал.



Фиг. 35 Флуоресцентни изображения на 72-часови биофилми на *P. aeruginosa* PAO1, формирани върху $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$ материали. Биофилмите са получени в система от двуканална проточна клетка върху покривни стъкла с нанесени хибриди при 30 °C и са визуализирани с багрило SYTO 9. Вляво – изглед отгоре, вдясно- 3D-снимка, долу- страничен изглед

Видът на субстрата също оказва влияние при прикрепяне към дадена повърхност. Бактериите са склонни да се прикрепят към стъкло, образувайки монослой, докато адхезията към хидрофобни повърхности е съпътствана от образуване на клетъчни струпвания [McEldowney et al., 1987]. Въз основа на проведените анализи, свързани с измерване на контактния ъгъл, става ясно, че SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали се определят като хидрофилни и наблюдаваният биофилм е под формата на монослой, което е в съответствие с данни от предишни изследвания.

Много клинично значими патогенни бактерии са в състояние да колонизират, формирайки биофилми, които трудно се повлияват от традиционните антибиотици поради формираната резистентост спрямо тях. Ето защо учените в редица изследвания обръщат все повече внимание на алтернативни материали с антибактериално действие като например сребърни наночастици, включени в полизахариди. Mohanty et al. (2012) в изследванията си показват редукцията на биофилми, образувани от *P. aeruginosa* и *S.*

aureus при условия *in vitro*. След 24 часово култивиране в присъствие на сребърни наночастици, стабилизирани в нишесте, авторите доказват 85% редукция на формирания биофилм. Относно механизма на действие, тези автори предполагат, че по всяка вероятност сребърните наночастици повлияват образуването на биофилм като инхибират синтеза на екзополисахариди, което е от значение при изграждането на биофилми. Velazquez-Velazquez et al. (2015) изследват антибиофилмовата активност на импрегнирани със сребърни наночастици покрития, използвани за медицински цели, като установяват високо ниво на инхибиране на образувания биофилм от патогенни, клинично изолирани щамове на *P. aeruginosa* и *E. coli*.

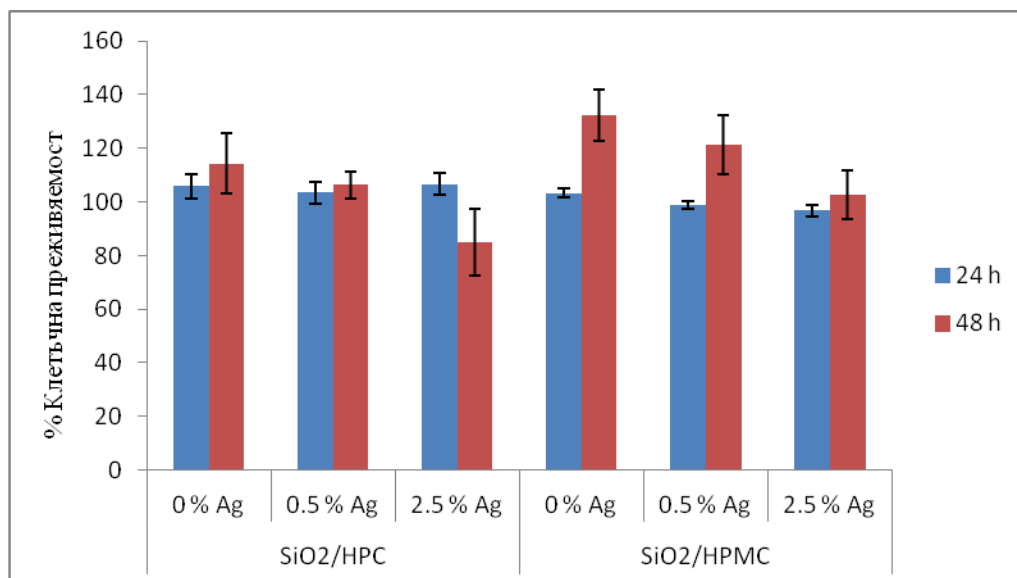
Получените данни от нас относно редукцията на формирания биофилм от *P. aeruginosa* PAO1 също потвърждават възможността за използване на изследваните хибридни материали в биомедицината.

6. Изследване ефекта на хибридните материали върху клетъчната пролиферация и адхезивността на миши фибробласти в моделна система

Хибридни материали на базата на различни полимери и силициеви производни предизвикват интереса на редица изследователи, поради тяхната биосъвместимост и обещаващо приложение в сферата на медицината [Schuleit & Luisi, 2001; Schultze et al., 2009]. Съвременните изследвания в областта на биоматериалите са фокусирани върху получаване на нови биосъвместими покрития с приложение в различни сфери на биомедицината. Gordon et al. (2014) работят върху покрития, съдържащи хидроксиапатит и сребро и намиращи приложения като биологични имплантанти. Резултатите им са обнадеждаващи и показват инхибиране растежа на *Staphylococcus aureus* и едновременно с това допринасят за растежа на фибробласти *in vitro*.

Редица автори твърдят, че омрежването на сребърните частици в хибридни материали и нановлакнести матове предполага намаляване на цитотоксичността на среброто за еукариоти [Fu et al., 2006; Melaiye et al., 2005]. Една от целите на настоящия дисертационен труд бе да се проведат анализи, свързани с проучване степента на цитотоксичност на синтезираните хибридни материали и възможността за тяхното биомедицинско приложение. Цитотоксичността на синтезираните хибридни материали е изследвана чрез MTS тест за клетъчна пролиферация. Клетъчната линия – 3T3 миши фибробласти е инкубирана за 24 и 48 часа с клетъчна среда, която е била в контакт с

изследваните SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC материали. Получените резултати са представени графично на фиг. 36.

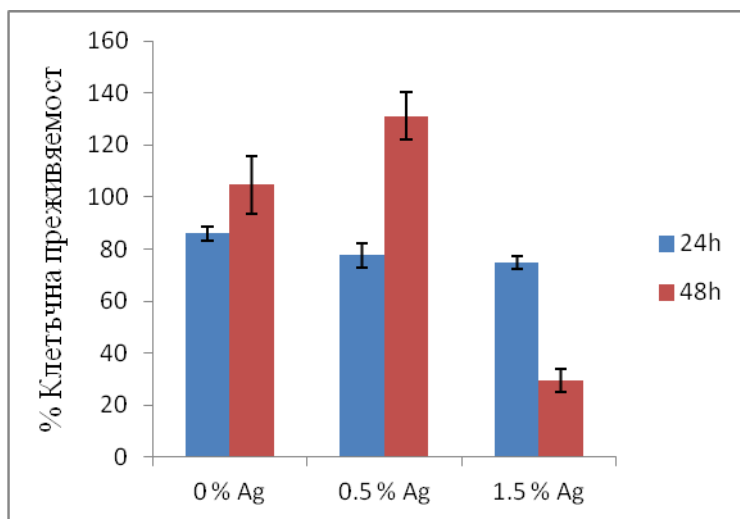


Фиг. 36 Клетъчна преживяемост на 3ТЗ клетки, инкубирани 24 и 48 часа с SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали с различно съдържание на сребро

От графиката се забелязва, че преживяемостта на клетките при 24 часа инкубиране е около 90-100% при различни концентрации на сребро. В случая и при двата материала среброто не показва цитотоксично влияние. След 48 часа инкубиране настъпват промени и клетъчната преживяемост е функция от сребърната концентрация. Наблюдава се линейно намаляване на клетъчната преживяемост с повишаване процентното съдържание на сребро и при двата хибридни материала, като по-ясно е отразено при SiO_2/HPMC хибриден материал, където и степента на клетъчна пролиферация спрямо 24-тия час е и по-отчетлива.

От представените резултати се забелязва тенденция за нарастване на клетъчната пролиферация при различните концентрации сребро след 48 часа инкубиране. Изключение настъпва само при $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\%\text{Ag}$ хибриден материал, където инхибирането на клетъчния растеж може да бъде обяснено и с нарастващата грапавост и невъзможност на клетките да адхезират към съответната повърхност. Доказателство за това е и измерената средна грапавост на този хибрид (около 3.22 nm), която е най-високата стойност при всички материали.

Цитотоксичността на SiO₂/CMC хибриден материал спрямо 3T3 миши фибробласти е демонстрирана на фиг. 37.



Фиг. 37 Клетъчна преживяемост на 3T3 клетки, инкубирани 24 и 48 часа с SiO₂/CMC хибридни материали с различно съдържание на сребро

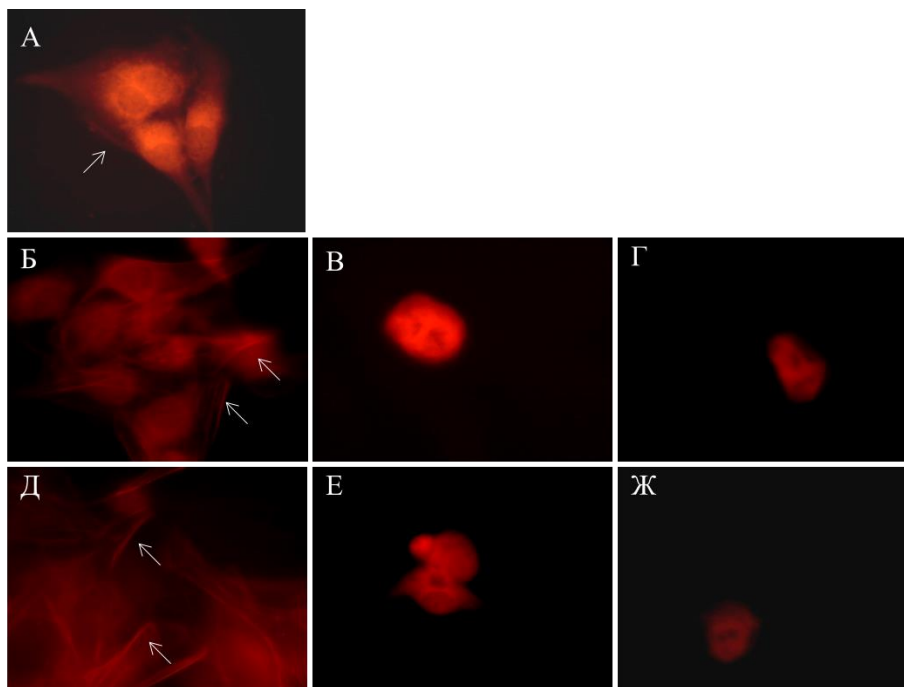
Аналогично на другите два материала преживяемостта на клетките при 24 часа инкубиране се запазва около 80%, независимо от съдържанието на сребро. След 48 часа инкубиране пробата без сребро и с 0.5 % съдържание на сребро, показват стимулиране на клетъчния растеж, докато най-високата изследвана сребърна концентрация (1.5 %) оказва инхибиращо въздействие върху 3T3 клетките. Тези резултати предполагат, че среброто в ниски концентрации би могло да влияе положително върху растежа на миши фибробласти, подобно на изследванията на Kawata et al. (2009), които също докладват за стимулиране растежа на чернодробна ракова клетъчна линия в присъствие на 0.5 mg/ml AgNps.

Първоначалните изследвания на цитотоксичността на сребърните хибридни материали показват добра поносимост на 3T3 клетки към тях, като с нарастване на концентрацията на сребърни наночастици в материала намалява преживяемостта на клетките.

Влияние на включеното сребро в хибридните материали върху цитоскелета на клетките. Оцветяване за актин с BODIPY 558/568 Phalloidin

Друг аспект от изследванията, свързани с миши фибробласти, е проучване възможностите на хибридните материали да служат като адхезивен субстрат на 3T3 клетките. Въз основа на проведения MTS тест, при който степента на клетъчна

пролиферация за SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали е сравнително висока, бяха избрани тези два материала за оцветяване с BODIPY. На фиг. 38 са представени адхезирали клетки към SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали след 24 часа инкубиране.



Фиг. 38 Флуоресцентни изображения на 3Т3 миши фибробласти, оцветени за актин с BODIPY 558/568 phalloidin върху А) контрола, Б) SiO_2/HPC , В) $\text{SiO}_2/\text{HPC}/0.5\% \text{ Ag}$, Г) $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$ Д) SiO_2/HPMC , Е) $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/0.5\% \text{ Ag}$ Ж) $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\% \text{ Ag}$ хибридни материали

От контролната проба ясно се вижда добра клетъчна адхезия и разстилане, като актинът е локализиран в периферията на клетката (фиг. 38 А). Хибридните материали SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC провокират засилена адхезия и формиране на монослой от равномерно разположени клетки. 3Т3 клетките показват типична морфология за фибробласти с добре изразени актинови филаменти, образуващи стрес фибри по цялата клетъчна дължина (фиг. 38 Б и Д, бели стрелки). След инкубация върху различните материали, съдържащи сребро, се наблюдава промяна в организацията на актиновия цитоскелет. Актиновите филаменти намаляват по брой и изтъняват и клетките се окръглят, като ефектът се засилва с увеличаване количеството на сребро. Микроскопските наблюдения разкриват, че дори наличието на сребро в ниска концентрация (0.5 %) води до намаляване на клетъчната адхезия. Забелязват се морфологични изменения и клетките

изглеждат окръглени (фиг. 38 В и Е). Клетките, култивирани в присъствие на 2.5 % Ag (фиг. 38 Г и Ж), се свиват, наблюдава се ниско флуоресцентно светене в сравнение с материалите без сребро и с 0.5 % Ag.

Данните предполагат, че клетъчната адхезия върху SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC хибридни материали зависи от прибавеното сребро. Тези резултати най-вероятно се дължат на промяна в регулаторния механизъм за синтез на актиновия цитоскелет [Xu et al., 2013], който е свързан с регулация на основните актин свързващи протеини като филамин [Asharani, Hande et al., 2009]. От друга страна резултатите предполагат, че клетъчната адхезия до голяма степен зависи от грапавостта на повърхността.

Първоначално проведените анализи за цитотоксичност на изследваните хибридни материали и способността на 3Т3 клетките да адхезират към повърхността им разкриват потенциала на хибридите да се използват за различни приложения в биомедицината. Хибридните материали SiO₂/HPC и SiO₂/HPMC не проявяват цитотоксично влияние, при SiO₂/CMC само най-високата изследвана концентрация сребро оказва потискащо въздействие след 48 часа инкубиране. От друга страна обаче, микроскопското наблюдение за установяване потенциала на материалите като адхезивен субстрат, разкрива добро прикрепяне на клетките без морфологични изменения само върху контролните проби. Необходими са допълнителни изследвания за установяване на генотоксичността на изследваните материали като промени в ядрата на клетките включващи свиване на ядрото, хроматинова кондензация и ядрено фрагментиране, както и определяне броя апоптични клетки. Задълбоченият анализ в тази насока ще потвърди безопасността и ефективността на материалите за човека.

Съчетанието между добре изразените антимикробни свойства на хибридните материали и високата степен на преживяемост на фибробластите ги прави привлекателен материал с приложение в различни области. Възможно практическо реализиране материалите биха намерили в регенеративната медицина като антибактериални превръзки и бинтове при зарастване на рани, хирургични маски, покрития на различни импланти и биоматериали с цел превенция на формиране на биофилми в организма и др. Интересна област на приложение е и селското стопанство, където те биха могли да се инкорпорират в различни филтри и пречиствателни съоръжения с цел почистване на отпадни и замърсени води.

IV. ОБОБЩЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд успешно са получени три типа неорганично-органични хибридни материали на основата на силициев диоксид, целулозни етери и включени сребърни наночастици по зол-гелен метод. За всички тях е използван TEOS като прекурсор на SiO_2 . Първите два хибрида съдържат съответно 5 тегл. % НРС и НРМС, а количеството на среброто варира от 0.5 до 2.5 тегл. %. Третият вид материал е със състав - 10 тегл. % СМС и сребро с концентрации от 0.5 до 1.5 тегл. %.

Повърхностната морфология на хибридните материали е изследвана чрез SEM-анализ. Хибридите без включени наночастици притежават сравнително гладка повърхност с вълнообразен характер. Допълнително проведенят микросондов анализ предоставя информация за химичния състав на хибридите и потвърждава наличието на сребърни наночастици. От TEM-изображенията на SiO_2 /СМС хибриден материал се забелязва, че по-високата концентрация сребро определя и по-малкия размер формирани се наночастици (около 5-10 nm).

Вторият метод, използван за структурно охарактеризиране на хибридните материали, е ВЕТ-анализът. Установена е взаимовръзка между сребърната концентрация и порьозността на материалите, т.е. по-високото съдържание на сребро води до намаляване на специфичната повърхност, размера и обема на порите. В най-общия случай упътняването на структурата на хибридните материали се дължи на по-високата концентрация сребро.

Повърхностната топография на материалите е наблюдавана и чрез AFM-анализ. Отново се потвърждава установеното от предходните анализи, че материалите без сребро са изключително гладки. Измерената повърхностна грапавост се увеличава с повишаване на сребърното съдържание. Забелязва се формирането на клъстери от наночастици при високите сребърни концентрации.

Важно значение за охарактеризирането на материалите заема и измерването на контактния ъгъл на равновесна водна капка, поради афинитета на човешки клетки да адхезират върху хидрофилни повърхности. Измерените контактни ъгли по-малки от 65 градуса определят хидрофилната природа на хибридните материали. От получените резултати се забелязва, че прибавянето на 0.5 % сребро повишава значително контактния воден ъгъл, което от своя страна води до намаляване хидрофилните свойства на

материалите. Поради тази причина те проявяват по-слабо изразени адхезивни свойства спрямо изследваните 3Т3 миши фибробласти. Тези данни имат съществено значение при използване на материалите в биомедицината.

Втората част от дисертационния труд е насочена към изследване антимикробните свойства на хибридните материали спрямо прокариотни и еукариотни микроорганизми. Като тест култури за Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии бяха използвани съответно *Escherichia coli* K12 и *Bacillus subtilis* 3562. Получените резултати показват правопрпорционално нарастване на инхибиторните зони с увеличаване на сребърната концентрация на всички хибридни материали и при двата щам. Въпреки това по-висок процент на инхибиране броя клетки се наблюдава при *B. subtilis* 3562 и затова той се определя като по-чувствителен щам спрямо въздействието на материалите в сравнение с *E. coli* K12.

Следващият етап от изследванията е свързан с проучване ефекта на хибридите спрямо еукариотни микроорганизми. Използваните дрождеви култури *Saccharomyces cerevisiae* 537 и *Candida albicans* 74 показват сходни по размери инхибиторни зони като различните сребърни концентрации не оказват съществено влияние върху големините на измерените зони. Растежът на клетките и на двата щам се редуцира във висока степен в присъствие на хибридните материали. Наблюдава се морфологичен диморфизъм на клетките на *C. albicans* 74 в присъствие на материали, съдържащи сребро. Той се изразява в преход на клетките от патогенна – мицелна форма в апатогенна – дрождева форма. Наблюдава се тенденция за намаляване броя единични колонии с течение на времето при всички бактериални и дрождеви култури. Това може да бъде обяснено с по-голямото количество сребро, освободено от материалите, както и с липса на хранителна среда за клетките.

Проведени са анализи, фокусирани върху изследване антигъбния ефект на материалите спрямо *Aspergillus niger* 371 и *Penicillium chrysogenum* 2303. Въз основа на проведените експерименти е установена по-силно изразена чувствителност на *P. chrysogenum* 2303 спрямо тестваните хибридни материали в сравнение с *A. niger* 371, базирана на измерените по-големи зони. Хибридите потискат растежа на плесените само в първоначалните етапи на култивиране, след което в по-късен етап се отчита невъзможност на материалите да окажат пълно инхибиране на щамовете и постепенно те започват да

прорастват дори в зоната, лишена в началото от растеж. Поради тази причина действието, което хибридни материали оказват върху изследваните тест щамове плесени, може да бъде определено като фунгистатично.

Допълнително е проучен и ефектът на SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC хибридни материали по отношение на адхезията и биофилм формирането на щам *P. aeruginosa* PAO1. Измерена е дебелината на биофилма, образуван върху материали без сребро и с 2.5 % сребро. От резултатите се забелязва, че среброто оказва въздействие върху растежа на бактериите, забавя го и това обяснява по-малката дебелина на слоя.

Последният анализ е свързан с проучване клетъчната преживяемост и адхезивността на миши фибробласти върху хибридни материали. Получените резултати разкриват нарастваща клетъчна пролиферация на 3T3 клетките, по-ясно изразена след 48 часа култивиране. По-високите сребърни концентрации водят до по-ниска клетъчна преживяемост. Това от една страна може да се обясни със свойствата на среброто като антимикробен агент, а от друга с по-високата грапавост и контактен ъгъл, определени при структурното охарактеризиране на материалите, съдържащи сребро. Микроскопското наблюдение за установяване потенциала на хибридите като адхезивен субстрат, разкрива добро прикрепяне на клетките без морфологични изменения само върху контролните проби без сребро.

Направената морфологична характеристика на получените хибридни материали, изследваните антимикробни свойства, както и първоначално проведените анализи за цитотоксичност и биосъвместимост разкриват потенциала на хибридите да бъдат използвани в различни сфери на биотехнологиите.

V. ИЗВОДИ

Въз основа на проведените експерименти могат да бъдат направени следните изводи:

1. Получени са SiO_2/CMC хибридни материали с включени сребърни наночастици със среден размер 5-10 nm. Материалите без сребро притежават гладка структура, но с увеличаване сребърната концентрация се установява уплътняване на структурата, повишава се повърхностната грапавост и среброто формира клъстери.
2. Хидрофилността на получените хибридни материали се повишава в посока $\text{HPC} < \text{HPMC} < \text{CMC}$. С повишаване на сребърната концентрация хидрофилността намалява, което възпрепятства клетъчната адхезия.
3. При прокариотните тест микроорганизми инхибирането на клетъчния растеж е най-силно изразено при *Bacillus subtilis* 3562 под влияние на $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\% \text{ Ag}$ хибриден материал.
4. $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\% \text{ Ag}$ хибриден материал проявява най-висок процент инхибиране спрямо *Saccharomyces cerevisiae* 537. При *Candida albicans* 74, в условие на високите сребърни концентрации, се наблюдава морфологичен диморфизъм. Установено е силно инхибиране на мицеларната структура, характерна за нейната патогенна форма.
5. Антигъбното действие на хибридните материали е най-силно изразено спрямо плесенни гъби от видовете *Penicillium chrysogenum* 2303 и по-слабо спрямо *Aspergillus niger* 371. Високите сребърни концентрации на SiO_2/HPMC хибридни материали повлияват процеса на спорулиране, което доказва тяхното фунгицидно действие.
6. Хибридните материали $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\% \text{ Ag}$ и $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\% \text{ Ag}$ редуцират дебелината на формирания биофилм от *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 с над 30 %.
7. И трите хибридни материала без сребро и с 0.5 % сребро не оказват цитотоксичен ефект, отчетен по пролиферацията на мишите фибробласти. С увеличаване на сребърното съдържание обаче се наблюдава слабо инхибиране на клетъчния растеж.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път успешно са получени хибридни материали в системата SiO_2 /целулозни етери с различно съдържание на сребро.
2. Получени са наноразмерни сребърни частици с големина, варираща в зависимост от количеството сребро и използваното целулозно производно.
3. Направена е детайлна характеристика на създадените хибридни материали:
 - повърхността на контролните проби без сребро показва висока степен на хидрофилност, кореспондираща с ниския контактен ъгъл и добре изразената клетъчна адхезия на мишите фибробласти;
 - с увеличаване концентрацията на сребро структурата на материалите уплътнява, повърхностната грапавост се повишава и тези фактори, както и антибактериалните свойства на среброто редуцират дебелината на формиращия се биофилм.
4. Доказан е висок биологичен ефект на хибридните материали спрямо тест култури на прокариотни, еукариотни микроорганизми и миши фибробласти. Наблюдава се по-висока чувствителност при Грам-положителните бактерии в сравнение с Грам-отрицателните, дължаща се на структурните особености на клетъчната стена.
5. Доказан е ефекта на високото съдържание на сребро в хибридните материали:
 - силно инхибиращо действие спрямо еукариотните микроорганизми;
 - способност да предизвиква морфологичен диморфизъм при *Candida albicans* 74;
 - потискане процеса на спорулация при *Penicillium chrysogenum* 2303.
6. Получена е нова информация за ефекта на повишената концентрация на сребро, която води до по-висока цитотоксичност и по-слаба способност на клетките да адхезират върху хибридите без да се наблюдават морфологични изменения.

Публикации във връзка с дисертацията:

1. **Ts. Angelova**, N. Georgieva, H. Dineva, N. Rangelova, R. Müller. Antifungal activity of silver doped hybrids based on silica and cellulose derivatives against *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 49, 2, 2014, 121-127.
2. **Ts. Angelova**, N. Rangelova, H. Dineva, N. Georgieva, R. Müller. Synthesis, characterization and antibacterial assessment of SiO₂-hydroxypropylmethyl cellulose hybrid materials with embedded silver nanoparticles. *J. Biotechnol and Biotechnol. Equipment*, 28, 2014, IF 0.760.
3. **Ts. Angelova**, R. Mohamed, N. Rangelova, N. Georgieva. Antifungal effect of SiO₂/cellulose ethers/Ag hybrid nanomaterials on the growth of *Penicillium chrysogenum* 2303. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 51, 2, 2016, 141-146.

Участия в международни и национални научни форуми:

1. **Ts. Angelova**, H. Dineva, N. Rangelova, N. Georgieva, S. Nenkova, L. Yotova. Entrapment of *Candida intermedia* PL 50 cells in sol-gel derived organic/inorganic hybrid materials. VII-та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2010, ХТМУ-София.
2. **Ts. Angelova**, N. Rangelova, N. Lazarova, N. Georgieva, R. Yuryev, R. Müller. Antibacterial activity of SiO₂/Carboxymethyl cellulose hybrid materials containing silver nanoparticles. IX -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2012, ХТМУ-София.
3. N. Rangelova, **Ts. Angelova**, L. Manoilova, N. Georgieva, R. Yuryev, R. Müller, S. Nenkova. Synthesis, structure and antibacterial activity of SiO₂/HPC/Ag hybrid materials. IX -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2012, ХТМУ-София.
4. **Ts. Angelova**, N. Lazarova, N. Georgieva, R. Bryaskova, D. Peshev, R. Tzoneva. Biomedical application of PVA-based hybrid materials and waste water treatment. X-та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2013, ХТМУ-София.
5. **Ts. Angelova**, N. Georgieva, N. Rangelova, R. Müller, C. Utpatel. Preparation and biofilm formation of silver doped hybrids based on SiO₂ and cellulose derivatives. Anniversary Scientific Conference with international participation, 60 years UCTM, Sofia, June, 4-6, 2013.
6. N. Rangelova, **Ts. Angelova**, N. Georgieva, R. Yuryev, R. Müller. Preparation and characterization of SiO₂/CMC/Ag nanomaterials with antibacterial properties. Anniversary

- Scientific Conference with international participation, 60 years UCTM, Sofia, June, 4-6, 2013.
7. N. Lazarova, **Ts. Angelova**, N. Rangelova, N. Georgieva, S. Nenkova, M. Dragnevskia. Antibacterial activity of modified wood based boards. Anniversary Scientific Conference with international participation, 60 years UCTM, Sofia, June, 4-6, 2013.
 8. N. Rangelova, S. Nenkova, N. Lazarova, **Ts. Angelova**, N. Georgieva. Modification of lignocellulose materials and its antibacterial activity. Anniversary Scientific Conference with international participation, 60 years UCTM, Sofia, June, 4-6, 2013.
 9. V. Uzunova, **Ts. Angelova**, T. Andreeva, N. Georgieva, R. Tzoneva. Impact of topography and Ag nanoparticles content of hybrid cellulose hydrogels on their biocompatibility. XI^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2014, XTMУ-София.
 10. **Ts. Angelova**, N. Georgieva, N. Rangelova, R. Müller. Antifungal activity of silver doped hybrids based on silica and hydroxypropyl cellulose. XI^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2014, XTMУ-София.
 11. **Ts. Angelova**, N. Rangelova, N. Georgieva, R. Müller. Antimicrobial behavior of SiO₂-CMC-silver based hybrid materials against *Saccharomyces cerevisiae* 537. I^{-ва} Национална конференция по Биотехнология – 30 години биотехнология в България, 17-18.10.2014, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”.
 12. V. Simeonova, **Ts. Angelova**, N. Rangelova, N. Georgieva. Antimicrobial behavior of HPC/SiO₂ hybrid materials doped with silver nanoparticles against *Candida albicans*. XII^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, XTMУ-София.
 13. I. Sablyova, **Ts. Angelova**, V. Uzunova, N. Georgieva, R. Tzoneva. Biocompatibility of SiO₂/HPC/Ag hybrid materials and antifungal activity against *Penicillium chrysogenum*. XII^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, XTMУ-София.
 14. V. Uzunova, S. Apostolova, **Ts. Angelova**, M. Aleksandrov, R. Toshkova, N. Georgieva, R. Tzoneva. Cytotoxicity of hydroxypropyl cellulose hydrogels containing silver nanoparticles. XII^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, XTMУ-София.
 15. **Ts. Angelova**, D. Pencheva, N. Rangelova, N. Georgieva. Influence of silica/cellulose/AgNps hybrids on the growth of multidrug-resistant human pathogenic microbes. XII^{-та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, XTMУ-София.

16. A. Shalaby, **Ts. Angelova**, N. Georgieva, A. Staneva, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, Y. Dimitriev. Preparation, characterization and antibacterial properties of $\text{ZnTiO}_3/\text{SiO}_2$ and $\text{RGO}/\text{ZnTiO}_3/\text{SiO}_2$ nanocomposites. XII^{та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, ХТМУ-София.
17. N. Rangelova, S. Nenкова, **Ts. Angelova**, N. Georgieva, M. Dragnevска. Preparation of wood based fiberboards for protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. Първа национална научна конференция по трудова медицина, работоспособност и безопасност при работа. 15.05.2015, МУ- София.
18. **Ts. Angelova**, T. Andreeva, V. Uzunova, N. Georgieva, R. Tzoneva. Investigation of biocompatibility and antifungal activity of silver doped hybrid materials based on silica and cellulose derivatives. 40th FEBS congress “The Biochemical Basis of Life”. 4-9.07.2015 Berlin, Germany.

Проектни участия и специализации:

1. Проект, финансиран от Фонд „Научни изследвания” (продължителност 3 години).

Член на колектив в проект с Договор DDVU 02-96/2010-2013г „Синтез и приложение на наноматериали за формиране на биофилми при пречистване на индустриални отпадъчни води”;

2. Проект, финансиран от оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“ (продължителност 2 години).

Участник в проект на тема: „Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии”.

3. Участие в лекционен курс, проведен в Болоня – Италия с финансовата подкрепа на Erasmus Mundus на тема “Innovation and technology management in medical and pharmaceutical biotechnology”. 1-12.07.2013 г.