

9. Авторска справка за оригиналните научни приноси в трудовете, включени в конкурса на доц. д-р Виктория Милкова Накова

за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „професор” в професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност Физикохимия“ по тематика „Адсорбция на биополимери върху моделна повърхност“

Научната ми дейност е свързана с изучаване на адсорбцията на полиелектролити върху моделни частици (твърди колоидни частици, липозоми и емулсионни капки) във водна среда, анализ на електричните свойства на формираните колоид-полимерни суспензии и тяхната стабилност.

Най-съществените резултати са получени с електрокинетични методи - светоразсейване в електрично поле, динамично светоразсейване и микроелектрофореза. Комбинацията от тези методи позволи подробно описание на повърхностните електрични свойства и стабилността на изследваните системи.

По тематиката на конкурса имам приноси в три основни направления:

- 1. изучаване на връзката между физикохимичните характеристики полизахариди (хитозан и алгинат) и тяхната способност да стабилизират моделни колоид-полимерни суспензии;**
- 2. получаване и характеризиране на многослойни филми от полизахариди и въглеродни наноматериали (въглеродни точки) върху несферични частици;**
- 3. разработване и охарактеризиране на моделни полизахарид-съдържащи системи за пренос и контролирано освобождаване на активни компоненти.**

Изследванията по първите две направления имат изцяло фундаментален характер, докато тези по третото направление са посветени на дизайн и охарактеризиране на моделни системи с потенциално приложение. И трите проблема са важни за колоидната наука, тъй като са свързани с модификация на повърхността на частиците и засягат както стабилността на дисперсните системи, така и възможността за техните приложения в практиката. Тематиката попада в изключително актуална и динамична област на

съвременната наука с оглед на възможностите за приложение в различни сфери на нанотехнологиите, медицината, фармацията и електрониката. Стабилни полимер-съдържащи структури с различна форма, състав, размер и функционалност могат да бъдат формирани чрез подходящ избор на компоненти и прецизен контрол върху условията на получаване .

Изследванията, включени в научните трудове представени за участие в конкурса са в съответствие с един от основните научни приоритети на Института по физикохимия: *Дизайн, охарактеризиране и оптимизация на комплексни течни среди и наноструктурирани материали за приложения в медицината, фармацията, хранителната и нефтената промишлености:* • *Функционализирани повърхности, декорирани микро- и наноструктурирани материали; приложения във фармацевтичната, химическата и нефтената промишлености;* • *Свойства и структура на комплексни течни състави, съдържащи синтетични и биосърфактанти, пептиди, протеини и полимери, бактерии и вируси; приложения за медицински и екологични цели;* • *Електрокинетична спектроскопия на колоид-полимерни системи;* • *Дизайн на (нано)капсули чрез послойна адсорбция на полимери върху колоидни частици и емулсионни капки*

В конкурса участвам с научни резултати получени предимно през последните 5 години. По тематиката на конкурса са представени 16 публикации, които са публикувани в международни научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация: Q1 (8 публикации), Q2 (6 публикации), Q3 (1 публикация) и 1 глава от книга. В конкурса участвам с 5 самостоятелни публикации (4 публикации в списания от квартал Q1 и 1 глава от книга). Включените в публикациите резултати са представени на 25 научни форума.

До момента, научните ми изследвания са обобщени в 41 научни труда, от които 36 са публикувани в международни реферирани научни издания: Q1 (21 публикации), Q2 (13 публикации), Q3 (1 публикация) и една глава от книга. Хирш индексът по Scopus е 12. Включените в тях резултати са получени при изпълнение на 12 проекта и са представени на 81 научни форума в страната и чужбина.

По тематиката на конкурса имам приноси в три основни направления:

1. Изучаване на връзката между физикохимичните характеристики полизахариди (хитозан и алгинат) и тяхната способност да стабилизират моделни колоид-полимерни суспензии (публикации от списъка № 1, 3, 9, 11, 16)

1.1. Адсорбция на хитозан върху стабилизирани с лецитин емулсионни капки

(публикации от списъка № 1, 11, 16: 1. **Milkova, V.** Electrosteric stabilization of oil/water emulsions by adsorption of chitosan oligosaccharides - an electrokinetic study. *Carbohydrate polymers* **2021**, 265, 118072. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118072>. (JIF=10.723, 2021, 2/56, Q1, оглавява ранглистата); 11. Goycoolea, F.M.; **Milkova, V.** Electrokinetic behavior of chitosan adsorbed onto o/w nanoemulsion droplets. *Colloids and Surfaces: A*. **2017**, 519, 205-2011. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.093>. (JIF=2.829, 2017, 70/147, Q2); 16. **Milkova, V.** Chitosan-stabilized oil-in-water nanoemulsions: electrokinetic properties. In K. Ramalingam (Ed.), *Handbook of Research on Nanoemulsion Applications in Agriculture, Food, Health, and Biomedical Sciences*, **2022** (pp. 44-58). IGI Global Scientific Publishing. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-8378-4.ch003>)

Хитозанът е кополимер на β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose, който се получава при деацетилиране на хитин, полизахарид който се извлича от насекоми, раци и някои гъби. Хитозанът е слаб полиелектролит (pKa ~6.5). Неговите уникални свойства (ниска токсичност по отношение на клетки и тъкани, биосъвместимост, биоразградимост, антибактериални, анти-туморни свойства и др.) го правят незаменим компонент в състава на платформи за различни приложения в бионанотехнологиите.

Като поликатион, хитозанът формира комплекси с отрицателно заредени биомолекули, ензими, взаимодействия с клетъчни мембрани и противоположно заредени частици (твърди частици, липозоми и много други). Като слаб полиелектролит, неговата плътност на заряда зависи от pH на средата и това е предимство за редица терапевтични приложения. Високата плътност на заряда на хитозана ($pH < pKa$) благоприятства неговото полиелектролитно поведение, докато при ниска зарядова плътност (pH над 7) неговата ниска цитотоксичност улеснява интрацелуларното освобождаване на биоактивни молекули или лекарства. Обаче, ниската плътност на заряда на хитозана води до слаба разтворимост във вода, агрегация в разтвора и слаба стабилност на хитозан-съдържащите структури. Редица теоретични и експериментални изследвания в литературата са показали,

че факторите които влияят върху стабилността на хитозан-съдържащи системи са концентрацията и зарядовата плътност (т.е. адсорбционните условия), както и размера на получените структури. Биологичната активност на хитозана в тези структури се определя от молекулното тегло, степен на ацетилиране (DA), pH, йонната сила концентрация на полимера, от какъв организъм (например, ракообразни или гъби) е получен и редица други фактори свързани със съответната процедура за получаване на структурите.

Ето защо, макар и малки промени в молекулната структура на хитозана, например молекули с еднакво молекулно тегло, но различна DA (или обратно) ще доведе до различно разпределение на заряда или различна зарядова плътност и съответно различни електрични свойства (респ. стабилност) или биологична активност на получените хитозан-съдържащи структури.

В допълнение, известно е, че в разтвор на напълно заредени полиелектролити част от противойоните претърпяват „противойонна кондензация“. Това явление се очаква когато средното разстояние между два заряда по дължината на полийонната верига е по-малко от дължината на Bjerrum (0.714 nm във вода при стайна температура). “Кондензираните” противойони имат намалена подвижност в сравнение с противойоните от дифузната част на двойния електричен слой. Тъй като в условията на проведените изследвания (pH 4.0– 4.7) хитозана се разглежда като силно зареден пополиелектролит, може да се очаква в близост до полийоните присъствие на противойони с намалена подвижност.

В сравнение със свойствата на полизахаридите, олигозахаридите на хитозана (COS) имат редица предимства в техните физикохимични характеристики и забележителни биоактивни свойства: много ниско молекулно тегло (под 3 900 g/mol), ниска степен на полимеризация (до 20 мономера), ниска степен на ацетилиране (около 10 %), нисък вискозитет и са напълно разтворими във вода. COS предлагат уникална възможност за провеждането на моделни изследвания върху адсорбционното поведение и разграничаване на приноса на различни взаимодействия между хитозана и противоположено заредена повърхност чрез подбр на DA и молекулното тегло на молекулите.

Целта на изследванията обобщени в това направление е анализ на корелацията между физикохимичните характеристики (молекулно тегло и DA) на поли- и олигозахариди на хитозана и електрокинетичното поведение на емулсии при различна концентрация на полимер. В проведените изследвания бяха използвани изключително чисти и много добре охарактеризирани проби от хитозани разтворени във вода или разтвор на HCl с моларност определена според характеристиките на всеки от хитозаните. В изследванията (в интервала pH 4.0– 4.7) молекулата може да се разглежда като напълно зареден поликатион. Тъй като хитозаните са разтворени в HCl, в разтвора се очаква наличието на Cl⁻ противойони. Бяха използвани oil-in-water наноемулсии (o/w) стабилизирани със соев лецитин, получени чрез метода на solvent displacement (първична емулсия). Всяка проба беше приготвена отделно чрез добавяне на различно количество хитозан към малък обем от първичната емулсия, а не чрез титруване (вторична емулсия).

Основни приноси:

- За първи път експериментално беше потвърдено твърдението за доминиращият принос на хидрофобните (при висока DA) и електростатичните (при ниска DA) взаимодействия между хитозановите мономерни и заредена повърхност.
- За първи път експериментално беше доказано, че електрокинетичен модел за анализ на промяната в електричните свойства дисперсия в присъствието на COS е полезен подход за разграничаване на приноса на електростатичните и хидрофобните взаимодействия отговорни за постигането на електростатична стабилизация на изследваните системи.
- Електрокинетичното поведение на вторични наноемулсии стабилизирани с лецитин в присъствие на различна концентрация на олигозахариди на хитозана (COS) с напълно незаредени 4 или 5 мономера показва, че ζ -потенциала на капките постепенно намалява (по абсолютна стойност), но не се постига презареждане на повърхността. Беше доказано, че адсорбцията на късите незаредени вериги е резултат от хидрофобни взаимодействия с хидрофобните домени на лецитиновия слой стабилизиращ емулсионните капки и намалението в електрокинетичния заряд се дължи на отместване на равнината на прехлъзване на двойния електричен слой. Същевременно, бяха регистрирани два режима на нарастване на дебелината на полимерния слой с нарастване на концентрацията на COS. Съгласно направената оценка беше установено, че при ниска

концентрация на COS се формира тънък монослой върху лецитиновия слой, докато с нарастване на концентрацията на хитозан се формират няколко молекулни слоя на повърхността поради вторични хидрофобни взаимодействия между самите молекули.

- Регистрираният електрокинетичен отговор от първична наноемулсия в присъствието на различна концентрация от смес на COS съдържащи заредени и незаредени мономерни е подобен на този от емулсионни капки в присъствие на полизахариди. Беше изказано предположението, че наблюдаваното поведение е резултат от баланса между електростатични взаимодействия между заредените мономерни и отрицателно заредените домени от повърхността, и хидрофобните взаимодействия между незаредените мономерни и хидрофобните домени от лецитиновия слой. Установено е, че доминиращ ефект в електричните свойства на покритите с COS емулсионни капки имат електростатичните взаимодействия.
- Дефинирана е критична степен на заряда на полизахариди на хитозана, отбелязана като DA 28 %. Електрокинетичните изследвания показаха, че при постепенно увеличаване на концентрацията на хитозан добавен към първичната емулсия, изоелектричната точка на капките и презареждането на повърхността им не зависят от молекулното тегло на полимера, когато $DA < 28\%$. Това се дължи на измереният ефективен, а не действителен заряд на частиците с адсорбиран полимер. При $DA > 28\%$, изоелектричната точка на капките и презареждането на повърхността се отместват към по-висока концентрация на полимер, тъй като U_{ef} зависи от броя на адсорбираните заряди, а не от молекулното тегло (или контурната дължина на полимера).
- Направено е предположението, че електричните свойства на адсорбираните полизахариди върху моделната повърхност зависят от баланса на ролята на молекулното тегло и DA. Беше установено, че електричната поляризуемост е комплексен параметър, който позволява да бъдат разграничени свойствата на хитозани с $DA < 28\%$, когато електрокинетичното поведение на частици/емулсионни капки е почти еднакво. Направена е оценка на фракцията освободени Cl^- противойони в резултат на адсорбцията на хитозаните на повърхността. Въз основа на допускането, че поляризацията на фракцията „кондензирани“ противойони в близост до полийонната верига дефинира електричните свойства на изследваните системи беше изчислена електричната поляризуемост на една полиелектролитна молекула.

- Направена е оценка на масовото съотношение между хитозан и лецитин (g хитозан/ 1 g лецитин). Установено, че адсорбираното количество хитозан (около 0.22 mg/m²) в стабилизирания емулсия не зависи от молекулното тегло и DA на полизахарида.

1.2. Адсорбция на хитозан върху моделни несферични колоидни частици

(публикация от списъка № 9. **Milkova, V.**; Radeva, Ts. Influence of charge density and calcium salt on stiffness of polysaccharides multilayer film. Colloids and Surfaces: A **2015**, 481, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.061>. (JIF=2.760, 2015, 56/144, Q2);

Целта на изследванията обобщени в това направление, е да се изследва влиянието на плътността на полизахаридите и добавянето на двувалентен електролит върху електричните свойства и „твърдостта“ на многослоен формиран от хитозан и пектин. Тези изследвания целят допълване на знанията за електро-оптичното поведение на многослойни филми от тези полизахариди върху моделни частици, които бяха предмет на изучаване в предишни изследвания (не участват в конкурса). За моделна повърхност са избрани елипсоидни нанокристали от β -FeOOH, чийто получаване, електрични свойства и стабилност са подробно изучени в нашата група.

Основни приноси:

- Установен е по-голям излишък на малки противойони във филма, когато последният адсорбиран слой е от хитозан в сравнение с тези от пектин: електро-оптичният ефект от суспензии от частици с адсорбиран полимерен филм с най-външен слой от хитозан, при ниски енергии на ориентация е по-висок в сравнение с този от пектин, но при висок интензитет на приложеното поле (т.е. при високи степени на ориентация близка до пълната ориентация в системата) той става по-малък от този на пектина. Изказано е предположението, че това се дължи на появата на еласто-хидродинамичен ефект, който доминира при висок интензитет на полето и благоприятства перпендикулярната ориентация на „меките“ частици спрямо посоката на приложеното електрично поле. Този ефект става още по-изразен с нарастване на дебелината на филма. Следователно, електро-оптичният метод може да предостави информация, макар и по косвен начин, за механичните свойства на

многослойните филми въз основа на зависимостта на електро-оптичният ефект от силата на приложеното електрично поле.

- Регистрирано е, че добавянето на двувалентни противойони към суспензия на частици с адсорбиран филм с най-външен слой от пектин води до увеличаване на електро-оптичния ефект. Изказано е предположението, че това е показател за по-плътното опаковане и съответно увеличение на твърдостта на филма в сравнение с филм без добавен електролит.

1.3. Адсорбция на алгинат върху моделни несферични колоидни частици

(публикация от списъка № 3. **Milkova, V.** Comparative electrokinetic study of alginate-coated colloidal particles. *Gels* **2023**, 9, 493. <https://doi.org/10.3390/gels9060493>. (JIF=5, 2023, 14/95, Q1)

Алгинатите са семейство полизахариди, които се изолират от морски водорасли. Те са разтворими във вода линейни блок ко-полимери изградени от (1-4)-linked poly-L-guluronate (G) and poly-D-mannuronate (M) остатъци. Структурата на алгината може да бъде описана като случайно или блоково разпределени хомо-полимерни участъци от G-остатъци (G-блок) и M-остатъци (M-блок) разделени от участъци, в които двата вида остатъци се редуват (MG-блок). Следователно, моларното съотношение на блоковете (съотношението M/G) и молекулното тегло са двете основни характеристики, които определят физикохимичните и биоактивни свойства на алгинатите. Присъствието на карбоксилни групи в структурата на молекулата на алгината определя полиелектролитното и поведение и следователно молекулата може се разглежда като силно зареден полийон.

Алгинатите притежават забележителен потенциал във фармацията и тъканната регенерация, тъй като те са биосъвместими, биоразградими, имат много ниска токсичност, те са сравнително евтин продукт и притежават способност за формиране на гелове поради силен афинитет към двувалентни катиони.

Целта на изследванията обобщени в това направление е анализ на корелацията между физикохимичните характеристики на избрани проби от алгинати върху електро-оптичното поведение и стабилността на водна суспензия от моделни несферични колоидни частици покрити с монослой от полимер. В проведените изследвания са използвани алгинати с

различно молекулно тегло и M/G съотношение. За моделна повърхност са избрани елипсоидни нанокристали от β -FeOOH, чийто получаване, електрични свойства и стабилност са подробно изучени в нашата група.

Основни приноси:

- Електрокинетичните изследвания показаха, че при постепенно увеличаване на концентрацията на алгинат добавен към суспензия от частици се регистрира постепенно намаление (по абсолютна стойност) на електрофоретичната подвижност, U_{ef} , на частиците. Това е следствие от частично екраниране на заряда на повърхността в резултат на адсорбцията на полимера. Установено, че изелектричната точка на частиците в присъствие на полимер не зависи от неговите характеристики (постига се при концентрация на алгината около 10^{-4} mg/mL). При по-нататъшно увеличение на концентрацията на алгинат се постига презареждане на повърхността и рестабилизиране на суспензията (при около 2×10^{-2} mg/mL).
- Известно е, че алгината има афинитет към двувалентни катиони. Ето защо се очаква влияние на характеристиките на полимера върху тези взаимодействия. Постепенното увеличаване на концентрацията на Ca^{2+} към стабилизирана суспензия на частици покрити със слой от алгинат, показва постепенно намаление на U_{ef} . Установено е, че намалението на U_{ef} е по-голямо колкото е по-ниско M/G съотношението или колкото е по-високо молекулното тегло на алгината. Освен това, установено е, че електрооптичният ефект (при 1 kHz) регистриран от стабилизирани суспензии на частици покрити с алгинат нараства до достигане на критична концентрацията на Ca^{2+} и намалява при по-висока концентрация. Тази критична концентрацията на Ca^{2+} (3×10^{-5} M) не зависи от характеристиките на алгината.
- Анализът на електро-оптичното поведение на стабилизирани суспензии на частици с адсорбиран полимер показва, че експериментално получената стойност на критичната честота, ν_{cr} , на ефекта (при 1 kHz) е значително по-ниска от тази регистрирана за частици без полимер. Същевременно, експерименталната стойност на ν_{cr} , е по-висока от пресметната теоретичната стойност (съгласно формулата на Schwartz за поляризация на кондензирани противойони с намалена подвижност по дължината на полийонната верига на силно зареден полиелектролит в разтвор на обикновен електролит). Ето защо беше предложено, че поляризацията на кондензирани Na^{+} противойони на малки

разстояния (например G-, M- M/G блок) по дължината на полийона е отговорна за регистрирания електро-оптичен ефект. Направена е оценка на фракцията кондензирани противойони освободени в резултат на адсорбцията на алгинат (без добавяне на Ca^{2+} йони). Този анализ е направен въз основа на теоретични модели, според които силно заредените полиелектролити запазват част от кондензираните си противойони при адсорбция върху слабо заредена повърхност.

- Установена е корелация между нарастването на електро-оптичния ефект (при високи енергии на ориентация, без добавяне на Ca^{2+}) и нарастването на фракцията на G-остатъци (или намаление на M/G съотношението), както и при увеличаване на молекулното тегло на полимерите. При ниски енергии на ориентация поведението на суспензията без добавяне на Ca^{2+} не зависи от характеристиките на алгинатите. В присъствие на много ниска концентрация на Ca^{2+} е установена корелация между нарастването на електро-оптичния ефект (при 1 kHz) и нарастването на фракцията на G-остатъци, което е обяснено с по-силно взаимодействие между двувалентните йони и молекулите на алгината.

2 Получаване и характеризирание на многослойни филми от полизахариди и въглеродни наноматериали (въглеродни точки) върху несферични частици

(публикация от списъка № 2. **Milkova, V.** Polysaccharide/carbon quantum dots composite film on model colloidal particles - an electro-optical study. *Polymers* **2023**, 15(18), 3766. <https://doi.org/10.3390/polym15183766>. (JIF=4.7, 2023, 19/95, Q1)

Дизайнът на многокомпонентни структури е обещаващ подход за получаване на функционални материали с потенциално приложение в биотехнологиите, фармацията и медицината. Измежду различните методологии за разработване на нови биосъвместими платформи (капсули, носители на лекарства, изкуствени клетки и др.), процедурите базирани на послойната техника (Layer-by-layer method), са изключително атрактивни тъй като предоставят невероятна гъвкавост по отношение на избор на компоненти с оглед на постигане на желана функционалност на получените структури.

По същество послойната техника е процес на последователна електростатична адсорбция на противоположно заредени компоненти върху заредена повърхност, като

крайния продукт е многокомпонентен комплекс стабилизирани чрез силни електростатични взаимодействия. От особен интерес са филмите формирани върху частици, като процедурата позволява включване на различни малки, заредени компоненти във филма и това води до получаване на многокомпонентна обвивка с желани свойства (функционални структури тип „ядро-обвивка“).

Въглеродните точки (Cdots) са сферични структури с размер под 10 nm, които имат значителни предимства пред класическите полупроводникови квантови точки съдържащи тежки метали – висока разтворимост и стабилност във вода, ярка фотолуминисценция във видимия спектър, ниска токсичност, биосъвместимост, висока химическа стабилност, фотостабилност, лесна функционализация и нискобюджетен синтез. Техните забележително характеристики дават възможност за различни приложения (биосензори, клетъчна визуализация, проследяване на лекарства, откриване на метални йони и много др.).

Целта на изследванията обобщени в това направление е получаване и охарактеризиране на стабилен многослоен филм от алгинат, хитозан и Cdots. Изследванията са проведени на базата на работната хипотеза, че стабилни композитни структури могат да бъдат формирани въпреки ниската плътност на отрицателния заряд на въглеродните наноматериали. Освен това, въпреки ниската им концентрация във филма, тяхното присъствие ще се отрази на електро-оптичното поведение и електричните свойства на суспензията от композитни частици.

Основни приноси:

- Методът светоразсейване в електрично поле беше приложен за първи път за изучаване на електричните свойства и стабилността на въглерод-съдържащи колоид-полимерни структури.
- Електрокинетичните измервания показаха осцилация в знака на стойността на електрофоретичната подвижност, U_{ef} , на частиците след добавянето на алгинат и хитозан, което е доказателство за презареждане на повърхността, успешна адсорбция на всеки от компонентите и ре-стабилизация на системата след всяка адсорбционна стъпка. Същевременно, абсолютната стойност на U_{ef} измерена за частици с последно адсорбиран слой от алгинат е по-висока в сравнение с тази за частици с външен слой от хитозан. Резултатите потвърдиха предишни изследвания, че стойността на U_{ef} зависи само от вида компонента адсорбиран в последната адсорбционна стъпка, но почти не

зависи от номера на слоя формиран от даден компонент. Тези резултати са в добро съответствие с предишни изследвания в групата посветени на изучаване на електричните свойства и стабилността на многослойни филми формирани само от полиелектролити върху моделни колоидни частици.

- Включването на Cdots във филма е в резултат на електростатичното взаимодействие между отрицателно заредените Cdots и положително заредените мономерни на хитозана адсорбиран на повърхността на филма в предходната адсорбционна стъпка. Добавянето на ниска концентрация на Cdots не води до презареждане на повърхността на частиците, а само до частично екраниране на заряда на хитозана, което е регистрирано чрез слабо намаление (по абсолютна стойност) на U_{ef} на частиците.
- Анализът на регистрираното електро-оптично поведение на суспензията от частици с адсорбиран полимерен филм показва, че електричната поляризуемост, γ , (подобно на U_{ef}) определена за суспензия на частици с най-външен слой от алгинат е значително по-висока в сравнение тази на частици с най-външен слой от хитозан, което се дължи на по-високата плътност на заряда на алгината. Този резултат потвърди предишни твърдения, че електричните свойства на компонента адсорбиран в последната адсорбционна стъпка, дефинира електро-оптичното поведение на суспензията от частиците покрити с многокомпонентен филм.
- Регистрирана е осцилация в зависимостта на електричната поляризуемост и дебелината на филма с номера на слоя. Резултатите показваха, че по-високата стойност на γ на суспензията от частици с полимерен филм външен слой от алгинат корелира с по-голяма дебелина на слоя. Същевременно, за частици с адсорбиран слой от хитозан, както и след добавянето на Cdots, γ и дебелината на филма намаляват. Предложен е механизъм на формирането на филма, при който аномалното поведение в осцилацията на дебелината и поляризуемостта на филма са обяснени с проява на допълнителни компенсаторни ефекти дължащи се на формирането на нестехиометрични комплекси в суспензията, които се адсорбират на повърхността при следващата адсорбционна стъпка.
- Анализът на динамиката на противойонния заряд на частиците покрити с многослоен филм потвърди предположението, че при адсорбция силно зареден полимер, при който се очаква „кондензация“ на част от противойоните, поляризуемостта на „кондензираните противойони“, които са намалена подвижност е отговорна за регистрираното поведение

от суспензията. Участието на дифузни H^+ противойони от Cdots в смесения слой от хитозан/ Cdots е пренебрежимо.

- Концентрацията на Cdots във всеки слой от филма е определена с UV-vis спектроскопия.

3 Разработване и охарактеризиране на моделни полизахарид-съдържащи носители за пренос и контролирано освобождаване на активни компоненти (публикации 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15)

(публикация от списъка № 4. **Milkova, V.**, Martinov, P., Vilhelmova-Ilieva, N., Iliev, I. Role of chitosan characteristics on the properties of curcumin-loaded carriers and their potential application in ophthalmologic infection therapy. *Polysaccharides* **2025**, 6, 22. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides6010022> (JIF=4.7, 2023, Q1, 19/95, 2023); 5. **Milkova, V.** Experimental study of the interaction of silica nanoparticles with a phospholipid membrane. *Sci* **2025**, 7, 6. <https://doi.org/10.3390/sci7010006>. (Q1); 6. Nikolova, I.; Paunova-Krasteva, T.; Petrova, Z.; Grozdanov, P., Nikolova, N.; Tsonev, G.; Triantafyllidis, A.; Andreev, S.; Trepechova, M.; **Milkova, V.**; Vilhelmova-Ilieva, N. Bulgarian medicinal extracts as natural inhibitors with antiviral and antibacterial activity. *Plants* **2022**, 11, 1666. <https://doi.org/10.3390/plants11131666> (JIF=4.5, 2022, 43/239, Q1); 7. Kamburova, K.; Dimitrov, I.L.; Hodzhaoglu, F.; **Milkova, V.** Investigation of the aggregation of A β peptide (1-40) in the presence of κ -carrageenan-stabilised liposomes loaded with homotaurine. *Molecules* **2024**, 29, 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules29153460>. (JIF=4.2, 2023, Q1); 8. Gyurova, A.; **Milkova, V.**; Iliev, I.; Lazarova-Zdravkova, N.; Rashev, V.; Simeonova, L.; Vilhelmova-Ilieva, N. Anti-coronavirus activity of chitosan-stabilized liposomal nanocarriers loaded with natural extracts from Bulgarian flora. *Life* **2024**, 14, 1180. <https://doi.org/10.3390/life14091180>. (JIF=3.2, 2023, 26/109, Q1); 10. **Milkova, V.**; Goycoolea, F. M. Encapsulation of caffeine in polysaccharide oil-core nanocapsules. *Colloid and Polymer Science* **2020**, 298, 1035-1041. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04653-0>. (JIF=1.931, 2020, Q2); 12. **Milkova, V.**; Kamburova, K.; Martinov, P.; Vilhelmova-Ilieva, N.; Rashev, V. Chitosan-based nanocarriers for delivery of remdesivir. *Sci. Pharm.* **2023**, 91, 37. <https://doi.org/10.3390/scipharm91030037>. (JIF=2.3, 2023, Q2); 13. **Milkova, V.**; Boshkova, N.; Grancharov, G.; Stoilova, O.; Boshkov, N. Corrosion behavior of hybrid zinc coatings based on chitosan and corrosion inhibitor BTA: effect of the molecular weight and ζ -potential. *Coatings* **2024**, 14, 495. <https://doi.org/10.3390/coatings14040495>. (JIF=2.9, 2023, 68/179, Q2); 14. **Milkova, V.**; Vilhelmova-Ilieva, N.; Gyurova, A.; Kamburova, K.; Dimitrov, I.; Tsvetanova, E.; Georgieva, A.; Mileva, M. Remdesivir-loaded nanoliposomes stabilized by chitosan/hyaluronic acid film with a potential application in the treatment of coronavirus infection, *Neurol. Int.* **2023**, 15, 1320-1338. <https://doi.org/10.3390/neurolint15040083>. (JIF=3.2, 2023, 82/280, Q2); 15. **Milkova, V.**; Goycoolea, F.M. Polysaccharide-stabilized capsules for delivery of indomethacin. *ChemistrySelect* **2023**, 8(26), e202204420. <https://doi.org/10.1002/slct.202204420>. (JIF=1.9, 2023, 142/231, Q3).

Целта на изследванията обобщени в това направление е получаване и охарактеризиране на моделни полизахарид-съдържащи носители за пренос и контролирано освобождаване на активни компоненти. В проведените изследвания са получени oil-core нанокапсули, липозоми и гелове натоварени с лекарство или други активни молекули, стабилизирани с един или повече слоя от противоположно заредени полизахариди. За постигане на насочено действие на носителите, на повърхността на някои от тях бяха допълнително адсорбирани подходящо селектирани аптамери (РНК) с изявен афинитет към съответната мишена. В допълнение, с цел изучаване на влиянието на наноструктури върху живите клетки, в проведено моделно изследване на взаимодействието между моделни наночастици и липидна мембрана (като модел на биологична мембрана).

Основни приноси:

- Получени са стабилни липозоми подходящи за капсулиране на различни биоактивни компоненти (медиамента Veklury®, хомотаурин или екстракти от лечебни български растения) стабилизирани с монослой от поли- и олигозахариди на хитозана, както и с многослоен филм формиран от хитозан и хиалуронова киселина или κ -карагенан. С помощта на софтуер с отворен достъп бяха селектирани аптамери (РНК), които имат изявен афинитет срещу спайк протеина на човешки коронавирус HCoV-OC43 и амилоид β (A β) пептид. Направен е анализ на влиянието на физикохимичните характеристики на полизахаридите, експерименталните условия (концентрации, рН, йонна сила, температура, комбинацията от полизахариди) върху размера, стабилността, количеството капсулиран агент. Проведени са микробиологични тестове и оценка на оксидативния стрес в присъствие на получените структури. Установено е, че при подходящ избор на полизахариди и експериментални условия, могат да се получат стабилни напълно биосъвместими липозоми, които да успешно да запазят биоактивните свойства на капсулираните вещества и осигурят техният насочен пренос и контролирано освобождаване.
- За първи път агрегацията на амилоидни пептиди е изследвана в присъствие на композитни структури натоварени с анти-амилоиден агент. Кинетиката на процеса е анализиран чрез проследване на промяната в полидисперсността на смесена суспензия на A β пептид и липозоми съдържащи хомотаурин. Оригиналноста на проведеното изследването се състои в това, че за първи път появата на първите агрегати и еволюцията

в агрегационния процес на A β е проследена индиректно чрез промяна на стандартните персентили (D10, D50 и D90) получени при анализ на измереното разпределение на частиците по размер.

- За пръв път са получени и успешно охарактеризирани стабилни липозоми натоварени с многокомпонетен воден екстракт от лечебни български растения (*Glycyrriza glabra* L.; *Sambucus nigra*; *Aesculus hippocastanum*; *Potentilla reptans*; *Allium sativum*) и е анализиран ефектът им върху човешки коронавирус HCoV-OC43.
- За пръв път е медикамента Veklury® (Gilead Science Inc., Foster City, CA, USA) беше капсулиран в полимерни капсули. Основната съставка на медикамента е ремдесивир, вещество което беше сред претендентите за лекарство срещу COVID-19.
- Получени са стабилни oil-core нанокapsули подходящи за капсулиране на активни молекули и лекарства (индометацин, медикамента Veklury®, куркумин и кофеин). За целта се получени O/W наноемулсии (първични емулсии) стабилизирани с лецитин, които допълнително бяха стабилизирани чрез адсорбция на дебел слой от хитозан или многослоен филм от хитозан/хиалуронова киселина (вторични емулсии). Разработена е нова процедура за получаване на филмите върху амулсионните капсули чрез използване на ниска концентрация на капки и полизахариди при ниска йонна сила на средата. При тези изследвания са приложени два подхода: капсулиране на слабо разтворими във вода вещества в маслената фаза и капсулиране на добре разтворими във вода вещества в полимерната обвивка. Чрез систематично изследване на влиянието на физикохимичните характеристики на полизахаридите бяха получени стабилни нанокapsули подходящи да капсулират висока концентрация на активния компонент. Изследвана е стабилността на получените структури и кинетиката на освобождаване на активния компонент в симулирани биологични среди (слюнка, очни флуиди).
- Изследван е ефекта от плътността на заряда на моделни наночастици и липиден слой върху взаимодействията между тях. За тази цел чрез последователна адсорбция на цвитерйонни липозоми и наночастици са формирани композитни филми върху макроскопична, плоска (хидрофилна или хидрофобна), силициева подложка. Кинетичният експеримент потвърди, че процеса на липидна адсорбция е дифузионно контролиран и зависи от рН и свойствата на субстрата. Адсорбцията на отрицателно заредените частици върху липидния моно –или бислой е резултат от електростатичното

взаимодействие с положително заредените домени от повърхността на мембраната. Установено е, че броят на адсорбираните липидни молекули и частици зависи от заряда на частиците и нетния заряд на мембраната: с увеличаване на заряда на частиците и мембраната, както и на хидрофобността на подложката, адсорбираното количество намалява.

- Чрез ion-induced gelation са получени и охарактеризирани хитозанови частици (наногелове), съответно празни и натоварени с корозионен инхибитор (бензотриазол). С цел повишаване на корозионната устойчивост на цинково покритие, получените частици бяха вградени в цинково покритие.

17.07.2025

Виктория Милкова