



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“



ФИЗИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕН ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „ФИЗИКА“

Александър Василев Григоров

**Модифицирани многослойни структури за имобилизиране на
биологично активни молекули**

Автореферат

на дисертационен труд

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

по област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,

професионално направление 4.1. Физически науки

*докторска програма „Електрични, магнитни и оптични свойства на кондензираната
материя“*

Научен ръководител: доц. д-р Ася Виранева

Пловдив, 2025

Дисертационният труд съдържа 165 страници, в които са представени 65 фигури и 12 таблици. Използвани са 220 литературни източника. Докторантът работи като асистент в Катедра „Физика“ към Физико-технологичен факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Експерименталните изследвания, свързани с дисертационния труд, са проведени в катедра „Физика“ към Физико-технологичния факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ и в лабораториите на Център по технологии към ПУ „Паисий Хилендарски“.

Във връзка с настоящия дисертационен труд са публикувани 4 научни статии в индексирани издания. Резултатите са представени на 4 международни научни форума.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Физика“ към Физико-технологичния факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 04.12.2025 г. Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 06.03.2026 г. от 11 ч. в Заседателна зала на ПУ „П. Хилендарски“ пред жури в състав:

доц. д-р Анелия Дакова

проф. д-р Емилия Михайлова

доц. д-р Ружа Харизанова

проф. д-р Цветанка Бабева

доц. д-р Стефка Касърова

Резервни членове:

доц. д-р Иван Бодуров

доц. д-р Катерина Лазарова

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересувашите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

	Съдържание	
I.	УВОД	4
II.	ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	5
III.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
3.1.	Материали	7
3.2.	Методи за получаване и охарактеризиране на полиелектролитни многослойни филми	9
3.3.	Методи за определяне активността и освобождаването на имобилизираните биологично активни вещества	10
IV.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	11
V.	ИЗВОДИ	29
VI.	ПРИНОСИ	30
VII.	ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	31
VIII.	ПРИЛОЖЕНИЯ	31

Използвани съкращения и означения

ПМК – полимлечна киселина

ПЕК – полиепсидон капролактон

ПЕГ – полиетилен гликол

СЕМ – сканиращ електронен микроскоп

ДСК - диференциално сканираща калориметрия

ЕДАК - 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид

БАВ – биологично активни вещества

I. УВОД

Модерните системи за контролирано освобождаване на различни видове биологично активни вещества позволяват таргетна доставка на използваното биологично активно вещество в третираните зони, като така намаляват не само общото количество необходимо вещество, но и позволяват преодоляването на различни фактори, намаляващи ефективността на използвания продукт. Първото поколение технологии за контролирано освобождаване са разработени в периода 1950-1980 година и са използвани предимно за получаването на различни видове хапчета и пластири. Втората генерация методи, разработени до 2010 година, се сблъскват с все повече и повече проблеми, породени от различните физикохимични и биологични фактори, оказващи влияние върху ефективността на доставяните биологично активни вещества. Някои фактори, като лоша водоразтворимост, голяма молекулна маса и трудности при по-финото контролиране на доставените количества, ограничават разработването на нови клинични продукти. Друг фактор, повлияващ развитието на нови методи за контролирана доставка, е реакцията на различните биологични системи, контролиращи преноса на биологично активните вещества в тялото. Всички тези причини възпрепятстват развитието на модерните системи за контролирана доставка (Y. Yun, et al. 2015).

Един от начините за преодоляване на факторите, ограничаващи разработването на тези системи, е създаването на различни многослойни структури, които да се използват за контролираното доставяне на биологично активните вещества директно в желаните зони (S. Park, et al. 2018). Подобни многослойни системи могат да бъдат под формата на различни микро и наночастици, както и на планарни структури и влакна. Този нов вид материали позволяват преодоляването на недостатъците, ограничаващи доставката на биологично активните вещества, чрез включването на веществото в структурата на слоевете. По този начин биологично активното вещество е изолирано от външни фактори, които могат да нарушат неговата ефективност или да възпрепятстват неговата абсорбция. Друго предимство е фактът, че действието на веществата може да бъде забавено до достигане на зоната за освобождаване, като по този начин намалят страничните реакции. Чрез контролиране на структурата и броя на слоевете, както и на вида на използваните материали, може да се постигне продължително контролирано освобождаване на определени количества биологично активно вещество (A. Schneider, et al. 2007).

Модерните системи за контролирано освобождаване използват голямо разнообразие от различни вещества, като полимери, полиелектролити и други. От голям интерес са различните биоразградими полимери (G. Kwon & D. Furgeson, 2007). Техният потенциал се дължи на факта, че при разграждането им не се отделят токсични продукти, което може да позволи използването им за създаване на изцяло биоразградими алтернативи на по-широко използваните медицински продукти. Подобни биополимери вече са намерили приложение като

медицински импланти и в тъканното инженерство (T. Biswal, 2021), където техните добри биосъвместими качества позволяват използването им в тялото без нежелани странични реакции. Тези биомедицински продукти са допълнително подобрени чрез нанасянето на различни биосъвместими слоеве, които притежават антибактериални свойства (B. Wang, et al. 2013; R. Pawar, et al. 2023). В последните години се провеждат все повече и повече изследвания върху потенциала на системи за контролирана доставка, използващи подобни биополимери. Въпреки това механизмите за контрол на доставката все още не са изцяло изяснени, а разработените до момента материали все още не притежават необходимите свойства за създаването на комерсиални продукти. Необходими са още изследвания, за да бъдат разработени по-добри изцяло биоразградими системи за контролирана доставка на биологично активните вещества.

Сред биополимерите, демонстриращи голям потенциал за разработването на подобни системи, са полимлечната киселина и поликапролактонът (S Liu, et al. 2020). Тези два биополимера се характеризират с добра биосъвместимост, биоразградимост и липса на токсичност, което ги прави идеални кандидати за създаването на различни биомедицински материали. Друга важна характеристика на биополимерите са повърхностните им свойства (C. Ha & J. Gardella, 2005), които са от голямо значение за тяхното приложение за създаването на системи за контролирана доставка на биологично активни вещества. И двата полимера обаче притежават някои недостатъци, които пречат за по-широкото им приложение. Въпреки отличната си биосъвместимост, полимлечната киселина се характеризира с биологична инертност и лоши механични качества, докато при поликапролактона бавната скорост на разграждане го прави подходящ за продългосрочни приложения, като медицинските импланти. Недостатъците на двата биополимера могат да бъдат преодоляни чрез използването на различни модификации, които да подобрят техните свойства (V. Lassalle & M. Ferreira, 2007). Също така свойствата могат да се подобрят и чрез комбиниране на различните полимери в композитни материали, като по този начин различните компоненти могат да компенсират лошите свойства на всеки от отделните материали (V Karagkiozaki, et al. 2012). Повърхностните свойства на биополимерите могат да бъдат подобрени не само чрез различни модификации (S. Nemani, et al. 2018), но и чрез нанасянето на различни биоразградими слоеве на тяхната повърхност (Y. Yu, et al. 2020). Това би позволило създаването на нови системи за контролирано освобождаване, включващи тези два материала, които да бъдат алтернатива на досега използваните небiorазградими системи.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Въз основа на направената литературна справка и систематизирането на научните публикации, разглеждащи многослойни структури, създадени върху модифицирани биоразградими и биосъвместими подложки на базата на полимлечна киселина и полиепсилон капролактон, относно приложението им като система за доставка на различни биологично активни вещества с

контролирано освобождаване, не бяха намерени достатъчно подробни изследвания.

Това обоснова и поставянето на основната цел на дисертационния труд, като изследване на възможностите за имобилизиране на различни биологично активни вещества в многослойни филми, отложени върху модифицирани подложки от полимлечна киселина и полиепсидон капролактон и използването им като лекарство доставящи системи.

За постигане на така поставената цел бяха формулирани и изпълнени следните задачи:

1. Получаване на различни видове полимерни филми, които да се използват за подложки при израстването на полиелектролитните многослойни структури.
 - 1.1. Получаване на полимерни филми на основата на полимлечна киселина
 - 1.2. Получаване на полимерни филми на основата на полиепсидон капролактон.
 - 1.3. Получаване на композитни филми на основата на полимлечна киселина и полиепсидон капролактон.
2. Модифициране на повърхността на получените полимерни филми, които ще се използват като подложки за получаването на многослойни структури.
 - 2.1. Модифициране на повърхността чрез зареждане в коронен разряд в положителна и отрицателна корона до начален повърхностен потенциал $\pm 1\text{kV}$ при стабилни условия.
 - 2.2. Модифициране на повърхността чрез химична модификация на повърхността с използването на EDAK.
 - 2.3. Модифициране на повърхността чрез лиофилизиране.
 - 2.4. Модифициране на повърхността чрез добавяне на полиетилен гликол.
3. Изследване на получените различни видове подложки, използвани за получаване на многослойни структури.
 - 3.1. Изследване на времевите зависимости на повърхностния потенциал на получените полимерни филми, заредени в коронен разряд.
 - 3.2. Изследване на морфологията със сканираща електронна микроскопия (SEM).
 - 3.3. Изследване на степента на кристалност с диференциално сканираща калориметрия (ДСК).
 - 3.4. Изследване на контактния ъгъл и повърхностната енергия.
4. Получаване на многослойни структури по метода на отлагане на полиелектролитни многослойни филми от хитозан и ксантан (казеин) върху всички видове филми, използвани като подложки.
5. Изследване на възможностите за имобилизиране на различни биологично активни вещества (бета-галактозидаза, бензидамин хидрохлорид и толфенамова киселина) в получените полиелектролитни многослойни филми.
6. Изследване на биологичната активност и кинетиката на освобождаване на използваните биологично активни вещества от многослойни филми, получени върху модифицирани подложки от полимлечна киселина и полиепсидон капролактон.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

В настоящия дисертационен труд са използвани следните вещества: полимлечна киселина, полиепсилон капролактон, хитозан, ксантан, казеин, както и биологично активните вещества: бета-галактозидаза, бензидамин хидрохлорид, толфенамова киселина и куркумин.

3.2. Методи за получаване, модифициране и охарактеризиране на полиелектролитни многослойни филми

3.2.1. Методи за получаване и модифициране на филмите

3.2.1.1. Получаване на непорьозни полимерни филми

За получаването на непорьозни полимерни филми 1 гр от дадения полимер (ПМК или ПЕК) беше разтворен в 50 мл хлороформ. Полученият разтвор беше излят в метално петри с диаметър 18 см и оставен да изсъхне върху нивелирана повърхност при стайна температура и атмосферно налягане до пълното изпарение на разтворителя. Полученият прозрачен тънък филм беше поставен във влажен ексикатор до пълното отлепяне на филма от дъното на петрито, след което беше съхраняван в сух ексикатор до последващото му използване. За получаване на непорьозен филм от смес от двата полимера беше използвана същата технология, като общата маса на двата полимера беше 1 гр за всички комбинации.

3.2.1.2. Получаване на порьозни полимерни филми чрез лиофилизиране

За получаването на порьозни филми чрез лиофилизиране, избраният полимер или комбинация от полимери се разтварят в 100 мл 1,4-диоксан и се замразяват на нивелирана повърхност при температура от -4°C и атмосферно налягане. Концентрацията на разтвора беше определена в зависимост от минималните количества полимер, от които може да се създаде лиофилизиран филм. За ПМК тази концентрация е същата като за непорьозен филм (2 гр на 100 мл), докато за ПЕК и филми съдържащи ПЕК концентрацията беше пет пъти по-висока (10 гр на 100 мл). След пълното им замръзване, филмите бяха поставени в лиофилизатор за 72 часа до пълното изпарение на разтворителя. Получените филми бяха съхранявани в сух ексикатор до последващо използване.

3.2.1.3. Получаване на порьозни полимерни филми чрез добавяне на полиетилен гликол

За получаването на порьозни филми чрез добавяне на полиетилен гликол към полимерните смеси от ПМК и ПЕК беше добавян 150 % w/v полиетилен гликол. След пълно хомогенизиране, разтворите бяха излети в стъклени петрити и поставени при стайна температура до пълното изпарение на разтворителя. Създадените филми бяха съхранявани в сух ексикатор.

3.2.1.4. Модифициране на повърхността на получените филми чрез метода на коронния разряд

Зареждането на образците беше извършено в коронен разряд при стайни условия с помощта на триелектродна система, състояща се от корониращ електрод (игла), плосък заземен електрод и решетка (управляващ електрод), разположена между тях.

На корониращия електрод беше подавано напрежение ± 5 kV, а на решетката напрежение ± 1 kV със същата полярност, както на корониращия електрод. Времето на зареждане в коронния разряд беше 1 минута.

3.2.1.5. Химична модификация

Освен зареждането в коронен разряд, за модификацията на полимерните филми беше използван и методът за химична модификация. Модификацията се изразява в третиране на филми от ПМК с 1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодинимид (ЕДАК). Химичната модификация беше използвана паралелно и в комбинация със зареждането в коронен разряд, като беше тествано влиянието на модификацията, както на незареден филм, така и преди и след зареждане в коронен разряд.

Химичната модификация на филмите от ПМК се извършва с цел модификация на повърхността за подобряване на хидрофобността и индуциране на свободни странични групи. Използваният за модификацията метод се основава на хидролиза на повърхността на полимерния филм. Процесът на химична модификация чрез хидролиза създава свободни $-\text{COOH}$ групи на повърхността на филмите от полимлечна киселина като за първоначалната модификация се използва натриева основа (NaOH), последвано от потапяне в ЕДАК, разтворен в метанол, за 4 часа при стаини условия. След модификацията филмите обилно се промиват с метанол и се оставят да изсъхнат преди да бъдат използвани за създаване на многослойни филми.

3.2.1.6. Получаване на полиелектролитни многослойни филми чрез метода на послойното отлагане

За получаване на многослойни полиелектролитни структури в настоящия дисертационен труд беше използвана автоматизирана система за получаване на слоеве тип Polystainer на фирма IUL,S.A. в режим на потапяне 15 минути и изплакване 5 минути.

Автоматизираната система работи в режим на потапяне с равномерна скорост и може да задържа подложката неподвижно в разтвора за определено зададено време, за да може покриващият материал да се закрепва към нея. Ако подложката е предварително заредена, а разтворите са полиелектролитни, при задържането повърхността на образеца сменя заряда си, защото нейният първоначален заряд се компенсира от този на разтвора и той става доминиращ. Преди потапяне във втория противоположно зареден електролитен разтвор образецът се изплаква, при което се отстраняват слабо свързаните молекули. Последователността на полиелектролитите се определя от вида на зареждане на филма, като топенето винаги започва с полиелектролита имащ заряд противоположен на този на филма. Описаната процедура създава два полиелектролитни слоя на повърхността на полимерния филм и се повтаря до достигане на желания брой слоеве (4 или 8 слоя).

Като полиелектролити бяха използвани разтвор на хитозан и разтвор на ксантан (или казеин), разтворени в буферен разтвор. Към така получените многослойни филми бяха имобилизирани различни биологично активни вещества.

3.2.2. Методи за охарактеризиране на филмите

3.2.2.1. Метод на вибриращия електрод с компенсация

Непосредствено след получаването на електретите беше измерван техният повърхностен потенциал. Измерването на повърхностния потенциал беше осъществено по метода на вибриращия електрод с компенсация с грешка, не надвишаваща 5%. Апаратурата, с която беше измерен повърхностният потенциал, включва: измерителна клетка, източник на постоянно компенсиращо напрежение, генератор на звукова честота, индикатор на нулевия сигнал и волтметър за измерване на компенсиращото напрежение. Големината и знакът на компенсиращото напрежение еднозначно определят големината и знака на повърхностния потенциал на електрета.

В резултат на вибрациите на електрода в електричното поле на електрета, периодично се изменя индуцираният върху електрода заряд и във външната верига протича променлив ток. При подаване на подходящо допълнително външно напрежение на вибриращия електрод, потенциалът му се оказва равен на повърхностния потенциал на електрета и електричното поле в междината става равно на нула, т.е. електродът вибрира в нулево електрично поле и във външната верига не протича електричен ток. Това напрежение се нарича компенсиращо, а методът – компенсационен метод. Подаването на компенсиращо напрежение се осъществява от източник на постоянно напрежение, снабден с регулатор, посредством който се подбира подходящата стойност на компенсиращото напрежение. По големината и полярността на компенсиращото напрежение се определя големината и знакът на ефективната повърхностна плътност на заряда, чрез формулата:

$$\sigma = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{L} U_k, \quad (1)$$

където U_k – е компенсиращото напрежение, ϵ е относителната диелектрична проникваемост на образеца, $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m е диелектричната

проникваемост на вакуума, L – дебелината на образеца.

3.2.2.2. Диференциално сканираща калориметрия (ДСК)

Диференциално сканиращата калориметрия спада към групата физични и физико-химични методи на термичния анализ, с помощта на които се определят енергетичните изменения в изследваното вещество. Той е основан на нагряване (или охлаждане) със зададена постоянна скорост на образец от изследваното вещество и термично инертно вещество, използвано в ролята на еталон, и измерване на компенсиращия топлинен поток, който поддържа температурите на образеца и еталона еднакви. ДСК изследванията бяха проведени с цел определяне на степента на кристалност и съвместимостта на използваните полимери при конструирането на композитните подложки. За целта беше използван уредът DSC 204 F1 Phoenix® на фирма Netzsch, Германия. Температурният му режим на работа $-180 \div 700^\circ\text{C}$, позволява линейна скорост на охлаждане и нагряване в интервала $0,001 \div 200^\circ\text{C}/\text{min}$ и максимален диапазон на измерванията ± 750 mW (τ сензор). Точността на измерване на енталпията е $< 1\%$. Температурната скала и тази на енталпите се калибрират с 5 вещества за планираните скорости на охлаждане и нагряване.

3.2.2.3. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

Определянето на морфологията на получените полимерни филми беше извършено с помощта на сканиращ електронен микроскоп (Prisma E SEM, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). За целта по два милиграма от изследваните проби бяха закрепени на алуминиеви държачи и покрити с въглерод и злато във вакуумен изпарител Quorum Q150T Plus (Quorum Technologies, West Sussex, UK). Изображенията бяха получени с помощта на детектор чрез ускоряване на електрони при ускорятелно напрежение от 15 kV при различни степени на увеличение на образа.

3.2.2.4. Метод на неподвижната капка

Методът на неподвижната капка беше използван за измерване на статични и динамични контактни ъгли. Измерването на контактния ъгъл е качествен начин за оценка дали повърхността има хидрофобни или хидрофилни свойства. Базира се на наблюдението на междумолекулните взаимодействия между повърхността и малка капка вода, когато капката се срещне с повърхността. Методът за определяне на контактния ъгъл е неинвазивен и бърз метод за определяне на омокряемостта на различни материали, включително биоматериали. Методът представлява аналитичен подход, широко прилаган за определяне на повърхностната свободна енергия на различни материали.

Измерванията на контактния ъгъл на изследваните образци бяха извършени при стандартни условия (при стайна температура и нормално атмосферно налягане) с два вида течности (вода и метилен йодид CH_2I_2). Малки капчици от 2 μl бяха внимателно поставяни върху повърхността на филмите с помощта на прецизна 10 μl микро спринцовка (Innovative Labor System GmbH, Германия). Върху всеки образец бяха поставяни по 6 капки, след което резултатите бяха осреднени и използвани за определяне на хидрофобността на всяка проба. Контактните ъгли бяха определени чрез измерване на тангенса на профила на падане от изображението, заснети с камера с висока разделителна способност. Обработката на изображенията беше извършена с помощта на софтуер ImageJ.

3.3. Методи за определяне активността и освобождаването на имобилизираните биологично активни вещества

3.3.1. Ензимолигичен метод за определяне на активността на имобилизираните в многослойните филми ензими

Ензимолигичният метод се използва за определяне на активността на имобилизираните в многослойните филми ензими и е специфичен за всеки вид ензим. За ензима бета-галактозидаза, използван в нашите изследвания, се използва ONPG методът. Той се базира на използването на орто-нитрофенил- β -галактозид, който при реакция с ензима се разгражда до орто-нитрофенол и галактоза. Процесът протича за многослоен образец с имобилизиран ензим, потопен в определено количество ONPG (0,9 мл разтвор добавен към 1,5 мл дейонизирана вода) за 60 минути на водна баня при температура 37 °C. На 30 и 60 минута от реакцията се взема 0,8 мл от разтвора и реакцията се спира с 4 мл едномоларен разтвор на Na_2CO_3 . Реакционният разтвор се изследва на спектрофотометър при дължина на вълната 405 nm за определяне на количеството синтезиран след реакцията орто-нитрофенол. Тестът беше повторен няколко пъти на всеки 24 часа за измерване на остатъчната активност на пробите при повторно използване.

3.3.2. Освобождаване на лекарствени вещества от получените многослойни филми

За определяне на профила на освобождаване на включеното в мултислоеве лекарство вещество, изследваните филми бяха потапяни във фосфатен буфер, имитиращ изкуствена слюнка (pH 6,8). Експериментът по освобождаване на лекарственото вещество беше провеждан при температура, близка до тази на човешкото тяло (37 ± 1) °C и при непрекъснато разбъркване с магнитна бъркалка при 50 rpm. През определени интервали от време от буфера се вземаха проби с обем 3 ml и след изваждането на всяка проба, към средата обратно се добавяше същото количество чист буфер. След това получените разтвори бяха соникирани за 5 минути и филтрирани през ChromafilVR филтър (0,45 µm). По три проби от всеки вид бяха изследвани по време на експеримента. Количеството лекарство вещество в разтворите беше определено с помощта на спектрофотометър Metertech SP8001 (Metertech Inc., Nangang, Taipei, Taiwan) при дължина на вълната от 306 nm според предварително подготвена калибрационна крива.

3.3.3. Математични модели, използвани за описание на процеса на освобождаване

За описание на процеса на освобождаване на лекарствени вещества от различни модифицирани полимерни матрици могат да бъдат използвани различни модели, отчитащи разтворимостта на лекарството, геометрията на матрицата-носител и механизма на освобождаване (N Abbasnezhad, et al. 2021; C. Corsaro, et al 2021). В настоящия дисертационен труд са представени няколко основни модела. За най-достоверен се счита моделът, за който коефициентът на детерминация R^2 е най-висок (близък до 1).

- **Модел от първи ред** – този модел може да се използва за описание на разтварянето на лекарството във фармацевтични форми, съдържащи водоразтворими лекарства в порьозни матрици:

$$\log C = \log C_0 - \frac{Kt}{2.303}, \quad (2)$$

където C_0 е началната концентрация на лекарството, K е константа на освобождаване, изразяваща се в s^{-1} , а t е времето за освобождаване.

- **Модел на Корсмайер-Пепас:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n, \quad (3)$$

където M_t/M_∞ е частта от лекарството, освободено в момента от време t , K е константа на Корсмайер-Пепас, а степенният показател n отчита механизма на дифузия.

- **Вайбул модел** – този модел може да се използва за изследване на освобождаването от матричен тип лекарство доставящи системи:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp \left[-\frac{(t-T)^b}{a} \right], \quad (4)$$

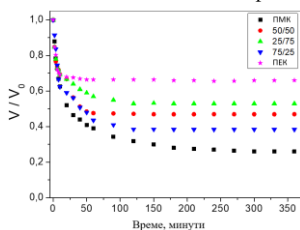
където M_t/M_∞ е частта на лекарството, освободено в момента t , а T отчита времето на забавяне, измерено в резултат на процеса на разтваряне. Параметърът a описва зависимостта от времето, докато b описва формата на кривата на разтваряне. За $b = 1$ формата на кривата съответства точно на формата на експоненциален профил; ако b има по-висока стойност от 1,

формата на кривата става сигмоидална, докато формата на кривата с $b < 1$ показва по-стръмно нарастване.

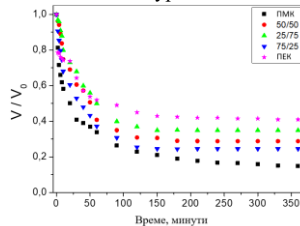
VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

6.1. Изследване на електричните свойства на получените композитни филми

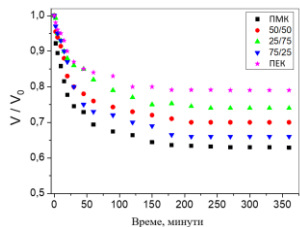
Времевите зависимости на нормирания повърхностен потенциал за всички видове изследвани филми са представени на Фигури 1-7.



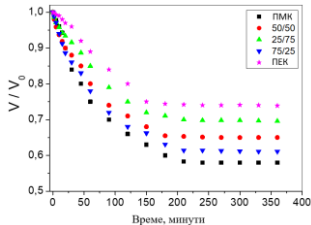
Фигура 1. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за непорьозни композитни филми от ПМК и ПЕК, зареждани в положителна корона.



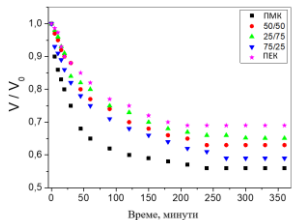
Фигура 2. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за непорьозни композитни филми от ПМК и ПЕК, зареждани в отрицателна корона.



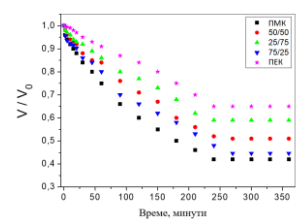
Фигура 3. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за порьозни композитни филми от ПМК и ПЕК, получени чрез лиофилизиране, зареждани в положителна корона.



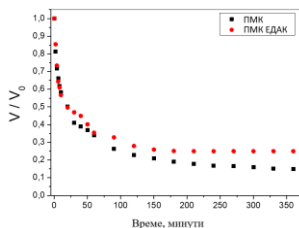
Фигура 4. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за порьозни композитни филми от ПМК и ПЕК, получени чрез лиофилизиране, зареждани в отрицателна корона.



Фигура 5. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за порьозни композитни филми от ПМК и ПЕК с включен полиетилен гликол, зареждани в положителна корона.



Фигура 6. Времеви зависимости на нормирания повърхностен потенциал за порьозни композитни филми от ПМК и ПЕК с включен полиетилен гликол, зареждани в отрицателна корона.



Фигура 7. Времени зависимости на нормирания повърхностен потенциал за непорьозни филми от ПМК и ПМК, модифицирани с ЕДАК, заредени в отрицателна корона.

Резултатите за установените стойности на нормирания повърхностен потенциал на 360-тата минута за всички образци са представени на Фигури 8-10.



Фигура 8. Установени стойности на нормирания повърхностен потенциал на 360-тата минута за положително и отрицателно заредени непорьозни композитни филми.



Фигура 9. Установени стойности на нормирания повърхностен потенциал на 360-тата минута за положително и отрицателно заредени порьозни композитни филми, получени чрез лиофилизиране.



Фигура 10. Установени стойности на нормирания повърхностен потенциал на 360-тата минута за положително и отрицателно заредени порьозни композитни филми с включен полиетилен гликол.

От получените експериментални резултати, представени на фигури 1-10 могат да се направят следните изводи:

- За всички изследвани образци стойностите на нормирания повърхностен потенциал първоначално спадат експоненциално като се наблюдава различно време на спадане за различните видове филми. Установено е, че експоненциалното спадане е през първите 60 минути при положително и отрицателно заредените непорьозни образци; през първите 120 минути за положително и отрицателно заредените порьозни лиофилизирани образци; и през първите 150 минути за положително и отрицателно заредените порьозни образци с включен ПЕГ. След това стойностите на повърхностния потенциал слабо намаляват и практически се стабилизират до 360-тата минута.

Беше установено, че стойността на повърхностния потенциал на електретите зависи от количеството на захванатите заряди в различни енергетични уловки на повърхността на образеца. В началния период от време след зареждането в корона, повърхностният потенциал бързо намалява. Това се дължи на освобождаването на слабо захванатите заряди от по-ниско енергетичните състояния (плитки уловки). След това повърхностният потенциал се стабилизира до определена установена стойност в резултат на по-здраво захванатите заряди на по-високо енергетичните състояния (дълбоки уловки).

- Установените стойности на нормирания повърхностен потенциал за образци, зареждани в положителна корона са по-високи от тези за образци, зареждани в отрицателна корона, независимо от вида на материала и начина на модифициране.

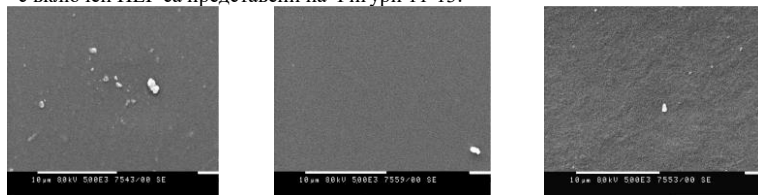
При зареждане в коронен разряд във въздух при атмосферно налягане върху повърхността на образеца се отлагат различни типове йони. Следователно зареждането в коронен разряд зависи от полярността на короната (J. Giacometti, et al. 1999). В случай на положителна корона йоните, които се отлагат на повърхността на образеца са $H^+(H_2O)_n$, а тези за отрицателна корона - CO_3^- . Тези йони се захващат на различни по дълбочина уловки и се освобождават от тях в зависимост от условията. В резултат на това положително и отрицателно заредените образци се различават по свойствата и стабилността си.

- Най-високи стойности на нормирания повърхностен потенциал и най-добри електретни свойства се наблюдават за образци от ПЕК, независимо от полярността на короната.
- Наблюдава се намаляване на стойностите на нормирания повърхностен потенциал с увеличаване на съдържанието на ПМК в изследваните образци.

Установените стойности на нормирания повърхностен потенциал са най-високи за лиофилизирани филми, независимо от вида на материала и полярността на короната. Това може да бъде обяснено с морфологията на изследваните образци, тъй като най-големите по размер пори бяха наблюдавани в лиофилизирани филми (T. Yovcheva et al. 2024).

6.2. Изследване на морфологията на получените композитни филми със сканиращ електронен микроскоп (СЕМ)

Беше изследвана морфологията на получените композитни филми чрез сканираща електронна микроскопия (СЕМ). Получените изображения за непорьозни филми, порьозни, получени чрез лиофилизиране и порьозни филми с включен ПЕГ са представени на Фигури 11-13.

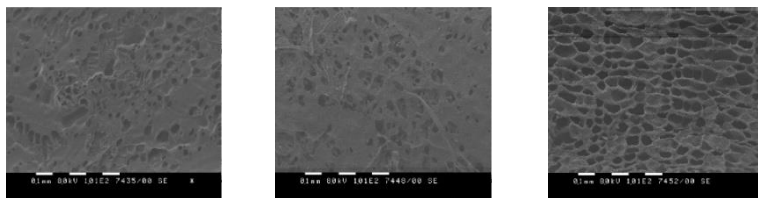


ПМК

50/50

ПЕК

Фигура 11. СЕМ изображения на непорьозни композитни филми от ПМК, ПЕК и 50/50.

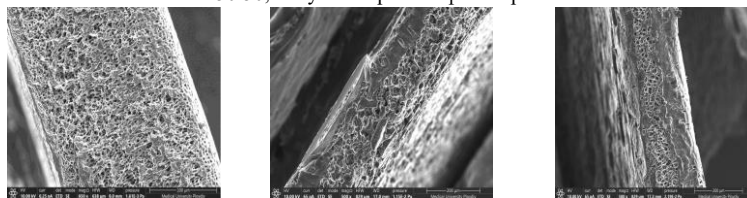


ПМК

50/50

ПЕК

Фигура 12. SEM изображения на порьозни композитни филми от ПМК, ПЕК и 50/50, получени чрез лиофилизиране.



ПМК

50/50

ПЕК

Фигура 13. SEM изображения на порьозни композитни филми от ПМК, ПЕК и 50/50 с включен ПЕГ.

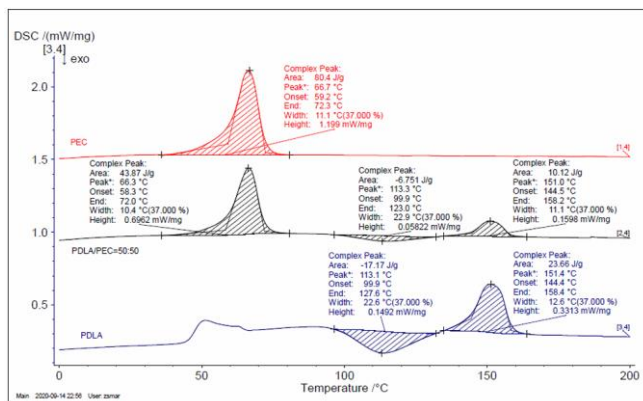
Резултатите, представени на фигури 11-13, показват, че непорьозните композитни филми се характеризират с гладка хомогенна структура. От представените изображения се вижда също, че и за двата вида порьозни филми, получени чрез лиофилизиране и с включен ПЕГ, се наблюдава пореста структура, която най-вероятно се дължи на специфичния метод, използван по време на тяхното създаване.

Поради водоразтворимия си характер, ниското молекулно тегло и наличността в течна форма може да се каже, че ПЕГ е отличен избор за създаване на микропорести структури от водонеразтворими полимери като ПМК и ПЕК и техните композитни смеси.

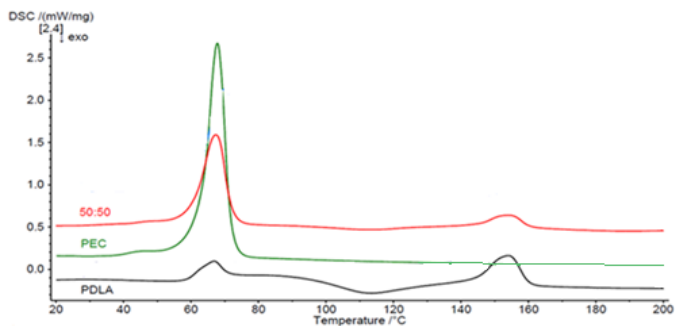
С най-големия си размер на порите, лиофилизираните филми от ПЕК позволяват по-голямо улавяне на заряди на повърхността си и спомагат за задържането им за продължителни периоди от време.

6.3. Изследване на степента на кристалност с диференциална сканираща калориметрия (ДСК)

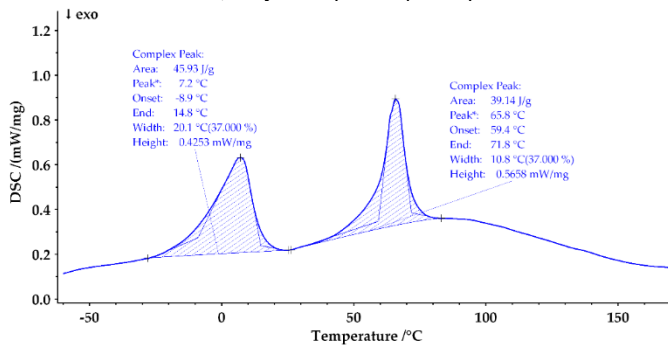
На Фигури 14-16 са представени термограмите на различните изследвани непорьозни и порьозни филми.

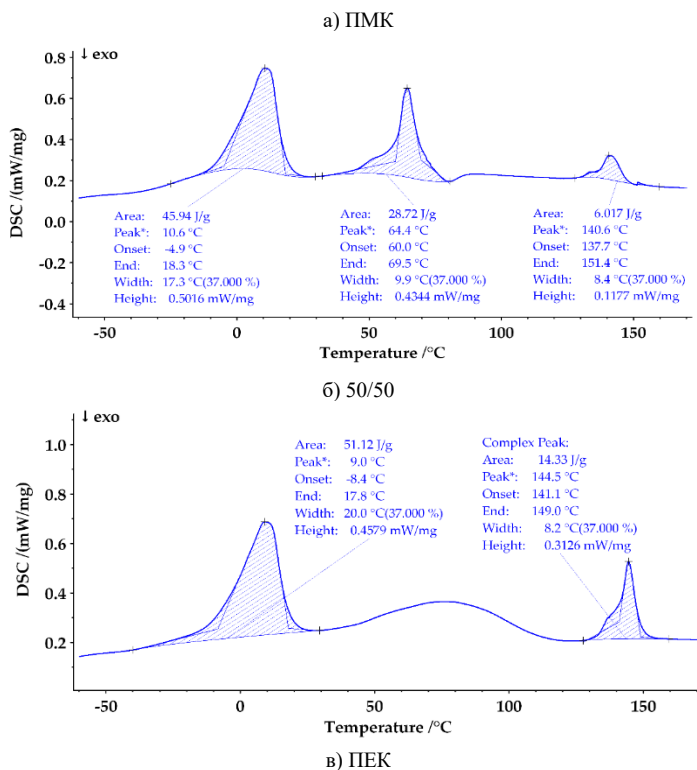


Фигура 14. Термограми за непорьозни композитни филми от ПМК, ПЕК и 50/50.



Фигура 15. Термограми за порьозни композитни филми от ПМК, ПЕК и 50/50, получени чрез лиофилизиране.





в) ПЕК

Фигура 16. Термограми за порьозни композитни филми от а) ПМК, б) 50/50 и в) ПЕК с включен ПЕГ.

В Таблица 1 са представени изчислените стойности за степента на кристалност за всички изследвани образци

Таблица 1. Степен на кристалност за всички изследвани образци.

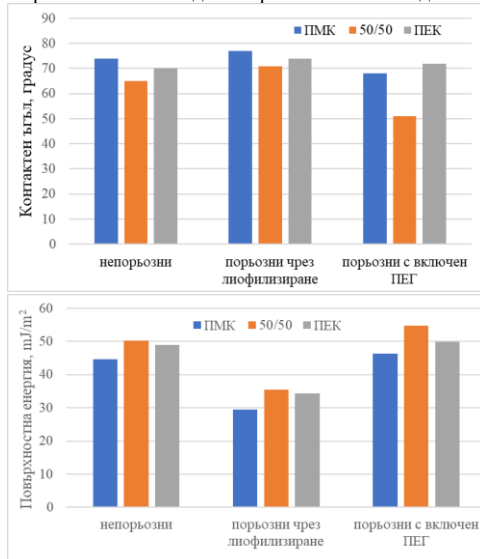
Образец	Обща кристалност, %		
	Непорьозни	Порьозни лиофилизирани	Порьозни с включен ПЕГ
ПМК	8	6	40
50/50	50	34	56
ПЕК	80	59	74

Резултатите, представени на Фигури 14-16 и Таблица 1, могат да бъдат анализирани и обобщени по следния начин:

- Топенето на композитните филми, независимо от метода на получаване, се случва при две температури, които са характерните температури на топене на ПЕК и ПМК. На база на резултатите може да се допусне, че ПМК и ПЕК са несмесеими на молекулярно ниво и формират хетерогенни зони.
- Температурата на встъкляване на ПЕК ($T_g \approx -63^\circ\text{C}$) не беше измерена по време на нито един от експерименталните процеси, което може да се дължи на високата степен на кристалност.
- Температурата на встъкляване на ПМК, както и температурата на топене както на ПМК, така и на ПЕК, за порьозни лиофилизирани образци са близки до тези, описани от други автори.
- Температурата на встъкляване (T_g) на ПМК за порьозни образци с добавен ПЕГ беше определена на 50°C , което е по-ниско от стойностите, дадени в литературата (I. Baena, et al. 2016). Това вероятно се дължи на пластифициращия ефект на полиетилен гликола.

6.4. Изследване на контактния ъгъл и повърхностната енергия на получените филми

На фигури 17 и 18 са представени стойностите на контактния ъгъл и на повърхностната свободна енергия за всички видове изследвани образци.



Фигура 17.
Стойности на контактния ъгъл за всички изследвани композитни филми.

Фигура 18.
Стойности на повърхностната енергия за всички изследвани композитни филми.

Резултатите, представени на фигури 17 и 18 показват, че повърхностната свободна енергия на филмите от ПМК е по-ниска от тази на ПЕК, независимо от метода, използван по време на тяхното създаване. Подобни резултати са получени в дисертационния труд на P. Wongwiwattana (2020).

Установено е също, че повърхностната свободна енергия на композитите от ПМК и ПЕК в съотношение 50/50 се увеличава в сравнение с чистите филми от ПМК и ПЕК.

При добавяне на ПЕК към ПМК в съотношение 50/50, повърхностната енергия се променя и достига стойности от 50,30 mJ/m² за непорьозни филми, 35,45 mJ/m² за порьозни, получени чрез лиофилизиране и 54,79 mJ/m² за порьозни с включен ПЕГ. Подобно поведение в стойностите на повърхностната свободна енергия и контактния ъгъл за композитните смеси от ПМК и ПЕК е наблюдавано от Alam и колектив (2021).

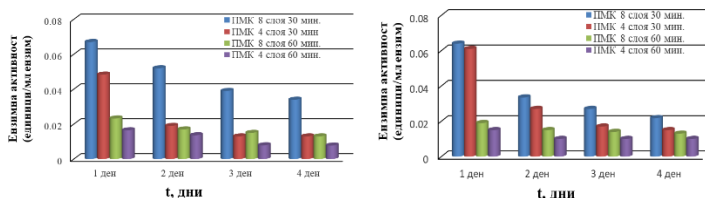
Това увеличение на повърхностната свободна енергия с увеличаването на съдържанието на ПЕК вероятно се дължи на увеличаването на размера на порите, както е показано при измерванията на повърхностната морфология (виж СЕМ изображения).

Стойностите на повърхностната свободна енергия се увеличават значително за порьозни филми с включен ПЕГ в сравнение с непорьозните, както и за композитните смеси (50/50) в сравнение с чистите филми от ПМК и ПЕК. Следователно, получената композитна смес притежава по-добри хидрофилни свойства от чистите филми (A Khandwekar, et al. 2011).

6.5. Изследване на ензимната активност и кинетиката на освобождаване на използваните биологично активни вещества

6.5.1. Бета-галактозидаза

Ензимната активност за положително и отрицателно заредени непорьозни филми от ПМК с 4 и 8 полиелектролитни слоя е представена на Фигура 19.



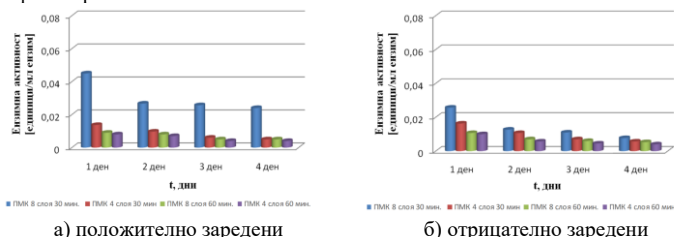
а) положително заредени

б) отрицателно заредени

Фигура 19. Ензимна активност на заредени непорьозни филми от ПМК с 4 или 8 слоя, измерена на 30-тата и 60-тата минута.

От представените резултати на Фигура 19 може да се види, че в случаите на имобилизиране на ензим в многослойни филми с 4 полиелектролитни слоя, отрицателно заредените филми показват 30 % по-висока активност на ензима бета-галактозидаза в сравнение с положително заредените такива. В случай на 8 слоя ефективността на имобилизация е сравнително по-добра независимо от вида на зареждане. Първоначалната активност на филмите с 8 слоя е около 25 % по-висока от тази на филми с 4 слоя. Степента на запазване на активността до 48 часа е също по-висока и е около 40 % до 50 % от първоначалната активност. Това може да се обясни с типа на омрежване, което се получава при специфичното третиране на гела, създаден от два полизахарида с различен електричен заряд. Допълнително е възможно двата полизахарида да взаимодействат помежду си в следствие на взаимодействието на електричните заряди, създавайки така наречените „джобове“, в които молекулите на ензима са физически позиционирани. Този вид физическа имобилизация дава на ензима пространствена свобода и достъп на молекулите на изследвания филм до неговия активен център.

На Фигура 20 са представени стойностите за ензимната активност за положително и отрицателно заредени порьозни филми от ПМК, получени чрез лиофилизиране.



Фигура 20. Ензимна активност на заредени лиофилизирани филми от ПМК с 4 или 8 слоя, измерена на 30-тата и 60-тата минута.

От представените на Фигури 19 и 20 резултати за ензимната активност на многослойните структури върху непорьозни и порьозни лиофилизирани чисти филми от ПМК могат да се направят следните изводи:

- В случай на имобилизиране на ензима бета-галактозидаза в многослойните структури върху положително заредени филми от ПМК се наблюдава по-висока ензимна активност в сравнение с отрицателно заредените такива, независимо от броя на полиелектролитните слоеве (4 или 8).

Това може да бъде обяснено със захващането на по-голямо количество заряди при зареждането в положителна корона и получаването на по-високи стойности на нормирания повърхностен потенциал с времето (Фигури 1 и 2).

- Когато ензимът е имобилизиран в многослойни филми с 8 полиелектролитни слоя ефективността на имобилизация е сравнително по-добра в сравнение с тази за филми с 4 полиелектролитни слоя, независимо от вида на филма (непорьозен или порьозен, получен чрез лиофилизиране) и полярността на короната.
- Първоначалната активност на филмите с 8 слоя е около 25 % по-висока от тази на филми с 4 слоя. Степента на запазване на активността до 48 часа е също по-висока и е около 40 % до 50 % от първоначалната активност.

По време на изследването на активността на ензима до 48 часа след първоначалната реакция беше установено, че около 30 % от началната активност на ензима се запазва и в двата вида многослойни филми. Получените резултати демонстрират перспективността на този метод на имобилизация в многослойни филми за реакции в асептични условия за време от 48 часа. Една възможна причина за намаляването на активността може да е промяната на условията на реакция, които засягат достъпа на изследвания филм до ензима, който се съдържа във вътрешните слоеве на многослойните филми. Друг фактор, който трябва да се вземе в предвид, е частичното разтваряне на горните слоеве на филмите, поставени в буферен разтвор с рН 5 за продължителен период от време.

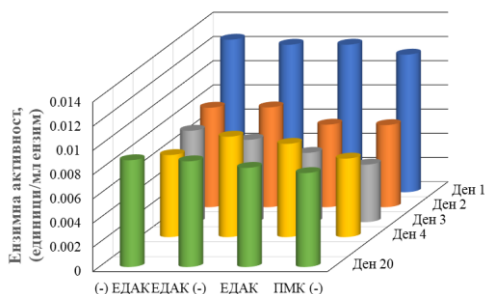
- Ензимната активност на многослойните структури върху порьозните филми от ПМК, получени чрез лиофилизиране е по-ниска в сравнение с непорьозните такива, независимо от полярността на короната и броя на полиелектролитните слоеве.

Това се дължи на факта, че порьозните филми, получени чрез лиофилизиране притежават по-порьозна структура, което води до захващане на

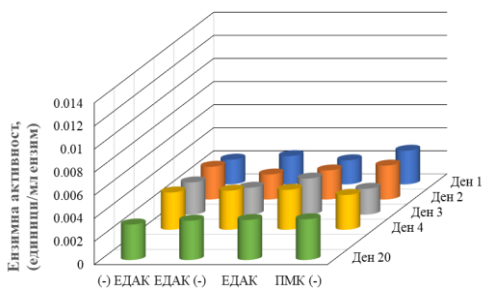
по-тънки слоеве от хитозан и ксантан. Това създава условия за по-слабо имобилизиране на ензим бета-галактозидаза в получените многослойни структури и следователно и до по-ниска ензимна активност.

Следователно непорьозните положително заредени филми от ПМК са най-подходящи за получаване на многослойни структури от хитозан и ксантан, в които успешно се имобилизира ензимът бета-галактозидаза. Този вид филми притежават най-добра ензимна активност в сравнение с останалите разглеждани чисти филми от ПМК.

Полиелектролитни слоеве с имобилизиран ензим бяха създадени и върху чисти подложки от ПМК, химично модифицирани с ЕДАК. Химичната модификация беше извършена с цел подобряване на повърхностните свойства на ПМК и по-доброто захващане на полиелектролитните слоеве. Резултатите от изследването на ензимната активност на многослойните структури върху непорьозни филми от ПМК и ПМК с ЕДАК са представени на Фигури 21 и 22.



Фигура 21. Ензимна активност на 30-та минута за многослойни структури, получени върху всички видове модифицирани подложки от ПМК.



Фигура 22. Ензимна активност на 60-та минута за многослойни структури, получени върху всички видове модифицирани подложки от ПМК.

От резултатите, представени на фигури 21 и 22 може да се заключи, че:

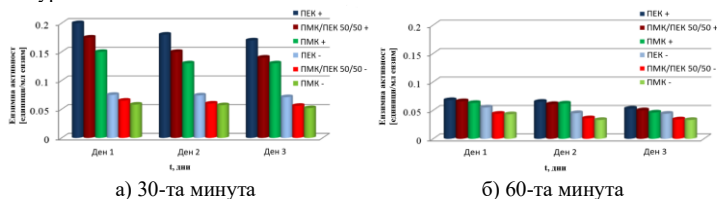
- химичната модификация с ЕДАК на подложката подобрява степента на запазване на ензимната активност във всички разглеждани случаи, като комбинацията на физична и химична модификация демонстрира по-високи стойности на ензимната активност независимо от вида на модифициране;
- получените експериментални резултати показват също, че нивото на активност намалява около 40 % след първия ден и остава сравнително стабилно за продължителен период от време (до 20 дни).

Наблюдаваният първоначален спад може да се дължи на слабо захванати ензимни молекули, които се отделят от полиелектролитните слоеве след първото използване на многослойния филм. Активността след втория ден се дължи на стабилно имобилизираните ензимни молекули, захванати в структурата на слоевете.

Увеличението на ензимната активност за химично модифицираните образци може да бъде обяснена с наличието на по-голям брой странични групи на повърхността на филмите, създадени по време на процеса на хидролиза с натриев хлорид, в сравнение с тези, създадени при повърхностната деградация по време на третирането в коронен разряд. Тези странични карбоксилни групи са допълнително активирани чрез третирането с ЕДАК, което променя вида на омрежването между повърхността на полимера и използваните за построяването на слоевете полизахариди. Поради факта, че и химичната и физичната модификация увеличават броя на страничните групи на повърхността на полимера, тяхната комбинация води до очаквани резултати като по-добро захващане на полиелектролитните слоеве и по-високо ниво на ензимната активност.

- Установено е, че комбинацията на химична и физична модификация е подходяща за подобряването на повърхностните свойства на чистите непорьозни филми от ПМК, както и за създаването на по-стабилни многослойни филми за имобилизиране на биологично активни молекули.

За определяне на влиянието на добавянето на ПЕК в структурата на ПМК филмите бяха създадени три вида композитни филми с различни масови отношения на двата биополимера (ПМК и ПЕК в отношение 75/25, 50/50 и 25/75), върху които бяха нанесени осем от полиелектролитните слоеве с имобилизиран ензим бета-галактозидаза, описани в началото на раздела. Бяха подготвени и многослойни филми от чисти ПМК и ПЕК. Резултатите от ензимната активност за положително и отрицателно заредени композитни филми са представени на Фигура 23.



Фигура 23. Ензимна активност на заредени композитни филми от ПМК и ПЕК с 4 или 8 слоя, измерена на 30-тата и 60-тата минута.

Представените на Фигура 23 резултати показват, че:

- Ензимът, имобилизиран в многослойните структури върху положително заредените филми, притежава по-високо ниво на активност в сравнение с отрицателно заредените такива, независимо от вида на филма и деня на измерване.
- Ензимната активност е най-висока в многослойните структури, създадени върху филми от чист ПЕК, и най-ниска в образци от чиста ПМК.
- Количеството ензимна активност е пряко свързано с процентното отношение на ПЕК в подложката, като филми с по-голяма концентрация на полимера

- притежават по-високи нива на активност на многослойните структури във всички разглеждани случаи.
- Ензимната активност намалява средно около 50 % за всички изследвани образци и остава стабилна до три дни при повторно използване, което съвпада с предишните разгледани многослойни филми върху чиста ПМК.
- Различната степен на имобилизация в многослойните структури, получени върху положително и отрицателно заредените филми, може да се обясни с по-голямото количество захванати заряди при зареждането в положителна корона (Фигури 1 и 2). По-високият повърхностен потенциал от своя страна спомага за по-доброто захващане на полиелектролитните слоеве и по-голямото количество имобилизиран ензим. Увеличението на ензимната активност с увеличаване на концентрацията на ПЕК в композитите може да бъде обяснено с по-високата степен на кристалност, определена с ДСК метода (Таблица 1).

Беше установено, че повишаването на ензимната активност нараства пропорционално с концентрацията на ПЕК в подложката, както в положително, така и в отрицателно заредените образци.

Получените експериментални резултати показват, че стабилизирането на ензимната активност потвърждава задържането на ензима в полиелектролитните слоеве, което позволява повторното използване на създадените филми. Така създадените филми могат да намерят потенциално приложение в различни сфери, изискващи многократното използване на един и същ филм за продължителни периоди от време.

Резултатите също показват, че включването на друг биополимер във филми от ПМК може да бъде използвано и за повишаване на нивото на имобилизация на биологично активни вещества в полиелектролитни слоеве, отложени на повърхността на подобни биополимерни композити.

6.5.2. Куркумин

Количеството куркумин, включено в полиелектролитните многослойни филми при различни стойности на рН и йонна сила на разтворите, както за положително, така и за отрицателно заредени филми, е представено в Таблица 2.

Таблица 2. Количество на включения куркумин в полиелектролитни многослойни филми

Вид на многослойните филми	Количество куркумин, μg	
	положителна подложка	отрицателна подложка
pH 3, 100 mM	0,391	0,862
pH 4, 100 mM	1,481	1,239
pH 5, 10 mM	2,234	1,868
pH 5, 100 mM	0,983	0,537
pH 5, 1000 mM	0,692	0,850

силата на разтвора над 100 mM при по-ниски нива на киселинност води до по-малко количество куркумин, включено в многослойните структури. Тези

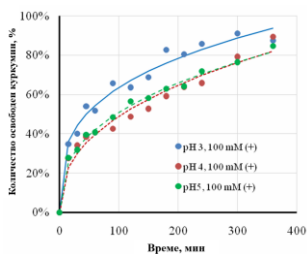
Резултатите, представени в Таблица 2, показват, че най-голямо е количеството на включения куркумин в полиелектролитни многослойни филми, изградени при pH 5 и йонна сила 10 mM. Второто най-голямо количество е при pH 4 и йонна сила 100 mM. Намаляването на нивото на pH до 3 и увеличаването на йонната

резултати са свързани с различната структура на полиелектролитните многослойни филми, конструирани при различните условия.

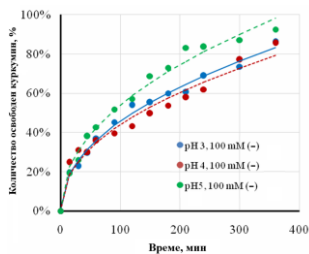
При рН 3 в резултат на силни електростатични взаимодействия възникват подредени плътни полиелектролитни слоеве с много малко пори. Тъй като куркуминът е електронеутрален, неговото включване се осъществява изцяло чрез дифузия. Поради липсата на достатъчно „празно“ пространство в слоевете, количеството на включения куркумин е значително по-малко.

Увеличаването на порьозността на структурите, която се реализира при по-високите йонни сили е неблагоприятно за включването на куркумина. Тъй като последният е нискомолекулуно съединение с относително малки размери, вероятно при по-големи пори в слоевете преобладава процесът на дифузия на биологично активното вещество от полиелектролитния многослоен филм към разтвор. Ето защо се оказва, че най-оптималните условия за включването на куркумин в полиелектролитните многослойни филми са при ниска йонна сила и рН 4 и 5.

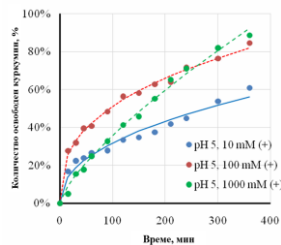
Зависимостите на освободеното количество куркумин от времето на освобождаване за многослойни филми, получени при различни стойности на рН и йонна сила, са представени на Фигура 24.



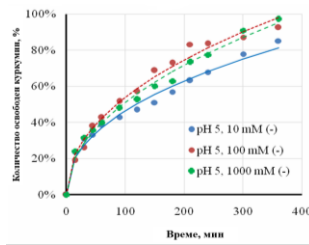
а) положително заредени при различни рН



б) отрицателно заредени при различни рН



в) положително заредени при различни йонни сили



г) отрицателно заредени при различни йонни сили

Фигура 24. Освобождаване на куркумин от многослойни филми при различни стойности на рН и йонна сила.

От представените резултати на фигура 24 може да се види, че скоростта на освобождаване на куркумина е сравнително стабилна при всички разглеждани условия, като до 40 % от веществото се освобождава през първия час, а до шестия освобождаването достига до 90 %. Най-ниска скорост на освобождаване се

наблюдава при йонна сила от 10 mM, което може да се дължи на повишената плътност на структурата на слоевете. Повишаването на структурата води до увеличаване на скоростта на освобождаване, предполагайки по-рехава структура. Промените в нивата на рН също влияят на скоростта, като при рН 4 се наблюдава най-бавно освобождаване. При положително заредените подложки се наблюдава намаляване на скоростта на освобождаване на имобилизираното вещество с увеличаването на рН, докато при отрицателно заредените подложки се наблюдава обратната тенденция. Като цяло от резултатите може да се направи заключение, че промяната на рН и йонната сила на полиелектролитните разтвори може да се използва за контролиране на параметрите на освобождаване на биологично активни вещества от многослойни полиелектролитни филми.

6.5.3. Бензидамин хидрохлорид

Беше изследвано влиянието на броя на полиелектролитните слоеве върху скоростта на освобождаване и количеството имобилизиран бензидамин хидрохлорид. Резултатите за количеството имобилизирано вещество са представени в Таблица 3.

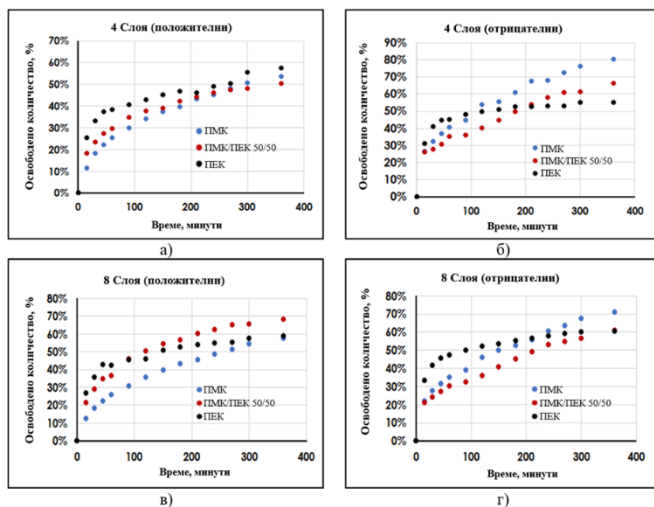
Таблица 3. Количество имобилизиран бензидамин хидрохлорид в многослойни филми, получени върху непорьозни композитни положително и отрицателно заредени подложки от ПМК и ПЕК.

Количество имобилизиран бензидамин хидрохлорид, μg				
Вид филм	Положителен заряд		Отрицателен заряд	
	4 слоя	8 слоя	4 слоя	8 слоя
<i>ПМК</i>	457.6572	593.6974	1004.33	1320.204
<i>ПМК/ПЕК 50/50</i>	396.1382	483.9637	536.8884	625.7096
<i>ПЕК</i>	944.0957	1023.681	2004.398	2476.466

От резултатите, представени в таблица 3, могат да се направят следните изводи:

- Количеството имобилизиран бензидамин хидрохлорид е по-високо във филми с 8 полиелектролитни слоя.
- Слоевете, построени върху отрицателно заредени филми, имобилизират по-голямо количество биологично активно вещество. Това може да се дължи на по-високия начален повърхностен потенциал за отрицателно заредените образци.
- Най-голямо количество имобилизирано вещество беше измерено за полиелектролитни слоеве, нанесени върху филми от ПЕК.

Графиките, представящи скоростта на освобождаване на бензидамин хидрохлорид за 4 и 8 слоя са показани на фигура 25.

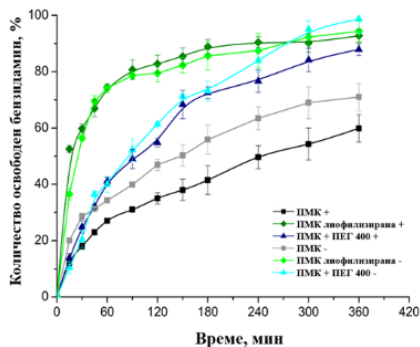


Фигура 25. Освобождаване на бензидамин хидрохлорид от многослойни структури с 4 и 8 слоя върху положително и отрицателно заредени подложки от ПМК, ПЕК и 50/50

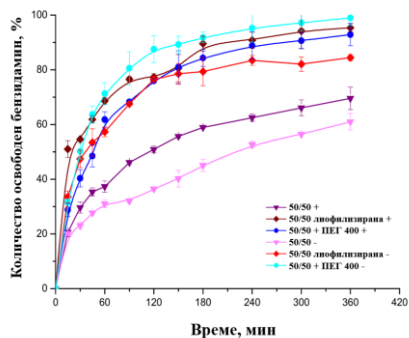
От графиките може да се види, че освобождаването на биологично активното вещество през първия час е около 30 до 50 %, а до шестия час се освобождават между 60 и 80 % от веществото за всички изследвани образци. Тези резултати демонстрират липсата на рязко освобождаване (бърст ефект) на имобилизираното вещество, което означава, че бензидамин хидрохлоридът е здраво захванат в полиелектролитните слоеве. По-голямата скорост на освобождаване при отрицателно заредените образци може да се дължи на факта, че при тях последният отложен полиелектролитен слой е от казеин, което намалява времето за дифузия на слоевете и позволява по-бързото освобождаване. Най-ниска скорост на освобождаване за многослойните структури върху положително заредени филми се наблюдава в чистите филми от ПМК, а за отрицателно заредените в композитите от ПМК и ПЕК (50/50).

Получените резултати показват, че профилът на освобождаване на бензидамин хидрохлорид може да бъде контролиран чрез промяна на състава и заряд на подложките от полимерни филми.

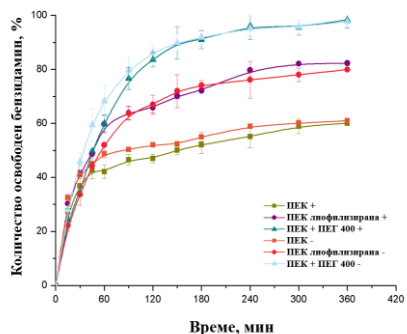
Беше изследвано влиянието на порьозността на чистите и композитни полимерни филми от ПМК и ПЕК, използвани като подложки, върху скоростта на освобождаване и количеството имобилизиран бензидамин хидрохлорид. Бяха използвани порьозни композитни филми от ПМК и ПЕК, получени чрез лиофилизиране и порьозни с включен ПЕГ. Резултатите от освобождаването са представени на Фигури 26-28 и в Таблица 4.



Фигура 26. Профил на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от многослойни филми, отложени върху положително и отрицателно заредени непорьозни, порьозни, получени чрез лиофилизиране и порьозни с включен ПЕГ подложки от ПМК.



Фигура 27. Профил на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от многослойни филми, отложени върху положително и отрицателно заредени непорьозни, порьозни, получени чрез лиофилизиране и порьозни с включен ПЕГ подложки от ПМК и ПЕК (50/50).



Фигура 28. Профил на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от многослойни филми, отложени върху положително и отрицателно заредени непорьозни, порьозни, получени чрез лиофилизиране и порьозни с включен ПЕГ подложки от ПЕК.

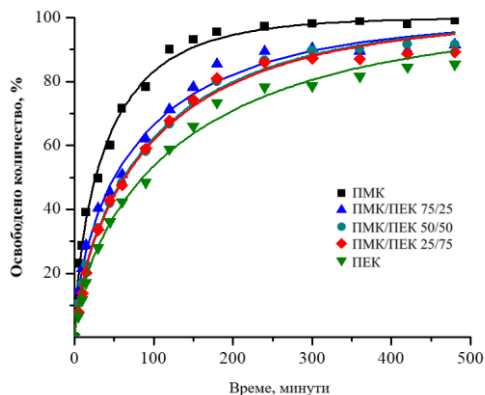
Таблица 4. Обобщени резултати за освобождаването на бензидамин хидрохлорид от непорьозни, порьозни, получени чрез лиофилизиране и порьозни с включен ПЕГ композитни филми от ПМК и ПЕК

Вид филм	Полярност	Структура	Количество имобилизиран бензидамин μг/4 cm ²	Освободено количество след 6 часа, %	Основен механизъм на освобождаване
ПМК	Положителна	непорьозен	593 ± 1.6	59 ± 5	Фикова дифузия
		лиофилизиран	588 ± 20	92 ± 3	Фикова дифузия
		с включен ПЕГ 400	98 ± 6	87 ± 2	Фикова дифузия + контролиран чрез набъбване транспорт
	Отрицателна	непорьозен	1320 ± 2.4	71 ± 5	Фикова дифузия
		лиофилизиран	168 ± 13	94 ± 4	Фикова дифузия + контролиран чрез набъбване транспорт
		с включен ПЕГ 400	50 ± 5	98 ± 5	Сложен
ПМК/ПЕК 50/50	Положителна	непорьозен	483 ± 1.7	69 ± 4	Фикова дифузия
		лиофилизиран	499 ± 60	95 ± 2	Фикова дифузия
		с включен ПЕГ 400	264 ± 18	92 ± 4	Фикова дифузия + контролиран чрез набъбване транспорт
	Отрицателна	непорьозен	625 ± 2.7	61 ± 3	Фикова дифузия
		лиофилизиран	313 ± 25	84 ± 1	Сложен
		с включен ПЕГ 400	183 ± 15	98 ± 3	Сложен
ПЕК	Положителна	непорьозен	1023 ± 6.8	60 ± 1	Фикова дифузия
		лиофилизиран	2526 ± 50	82 ± 1	Фикова дифузия
		с включен ПЕГ 400	361 ± 38	98 ± 3	Фикова дифузия + контролиран чрез набъбване транспорт
	Отрицателна	непорьозен	2476 ± 6.6	60 ± 1	Фикова дифузия
		лиофилизиран	684 ± 34	79 ± 1	Сложен
		с включен ПЕГ 400	350 ± 41	97 ± 2	Сложен

От представените резултати на Фигури 26-28 и Таблица 4 може да се види, че структурата на филма играе голяма роля и може да бъде използвана за контролиране на имобилизирането и освобождаването на биологично активни вещества от полиелектролитни многослойни структури, отложени на повърхността на различни модифицирани композитни филми.

6.5.4. Толфенамова киселина

Кинетиката на освобождаване на толфенамова киселина от полиелектролитни многослойни филми, отложени върху порьозни положително заредени подложки от ПМК и ПЕК, получени чрез лиофилизиране са представени на Фигура 29.



Фигура 29. Освобождаване на толфенова киселина от полиелектролитни многослойни филми, отложени върху положително заредени порьозни композитни подложки от ПМК и ПЕК, получени чрез лиофилизиране. Получените резултати показват, че:

- Процесът на освобождаване на лекарството протича в една фаза и не се наблюдава изразено рязко начално освобождаване (бърст ефект). Този вид процес е характерен за освобождаване на не-водоразтворими вещества, като толфеновата киселина (M. Józó, et al. 2021).
- Общото количество освободена толфенова киселина е в рамките на 40 до 70% през първия час и между 85 и 100% след първите 8 часа. Следователно може да се заключи, че се постига пълно освобождаване на лекарственото вещество за 8 часа.

VII. ИЗВОДИ

От представените експериментални резултати могат да се направят следните изводи:

1. Приложеното електрично поле, в резултат на зареждането в коронен разряд, допринася за по-лесно захващане на полиелектролитните слоеве и за имобилизиране на по-голямо количество биологично активно вещество.
2. Повърхностните модификации, като третирането в коронен разряд и химичната модификация на полимерните филми, които се използват като подложки, върху които се изграждат многослойните структури, подобряват техните повърхностни свойства и спомагат за контролиране на процеса на освобождаване на имобилизираните вещества.
3. Създаването на пори чрез лиофилизиране или чрез добавяне на полиетилен гликол в структурата на полимерните филми, които се използват като подложки за многослойните структури, повишава количеството имобилизирано вещество и забавя неговото освобождаване.
4. Комбинирането на двата изследвани полимера в композитни филми, които се използват като подложки за многослойните структури, води до промени в степента на имобилизация и скоростта на освобождаване на биологично

активните вещества, зависещи от отношението на полимерите в композитите.

5. Увеличаването на броя на полиелектролитните слоеве води до увеличаване на количеството имобилизирано вещество.
6. Имобилизирането на ензима бета-галактозидаза в полиелектролитните многослойни филми запазва неговата активност за продължителни периоди от време при повторно използване.
7. Свойствата на освобождаването зависят не само от свойствата и структурата на използваните подложки, но и от вида на имобилизираното вещество.
8. Варирането на свойствата на полимерните подложки и на полиелектролитните слоеве позволява контролирането на свойствата на освобождаване на имобилизираните биологично активни вещества.

VIII. ПРИНОСИ

- За първи път беше изследвано и установено влиянието на електричното поле, в което се модифицират композитните лиофилизирани и химично модифицирани подложки от полимлечна киселина и полиепсидон капролактон, върху кинетиката на освобождаване на различни биологично активни вещества от многослойните структури, изградени върху тези подложки.
- За първи път беше изследвано влиянието на различни видове модификация на полимерните филми върху имобилизирането на биологично активни вещества в полиелектролитни многослойни структури, построени на тяхната повърхност.
- За първи път бяха създадени многослойни структури върху короно заредени порьозни композитни подложки на основата на ПМК и ПЕК и беше установено влиянието на получената пореста структура върху имобилизирането и контролираното освобождаване на различни биологично активни вещества
- За първи път бяха създадени многослойни полиелектролитни слоеве от хитозан, ксантан или казеин на повърхността на модифицирани полимерни филми от полимлечна киселина и полиепсидон капролактон за имобилизиране на биологично активни вещества.
- За първи път бяха изследвани ензимната активност на бета-галактозидаза и освобождаването на бензидамин хидрохлорид, толфенамова киселина и куркумин от изцяло биоразградими полиелектролитни многослойни композитни полимерни структури.
- Беше потвърден потенциалът на изследваните полиелектролитни многослойни структури, изградени върху подложки от полимлечна киселина и полиепсидон капролактон, за създаването на системи за имобилизиране и контролирано освобождаване на различни биологично активни вещества.

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

Пълният литературен обзор и списъкът с цитираните литературни източници могат да бъдат намерени в дисертационния труд.

X. ПРИЛОЖЕНИЯ

Списък с научни публикации, свързани с дисертационния труд:

1. Viraneva, A., Marudova, M., Milenkova, S., Grigorov, A., & Yovcheva, T. (2024). Investigation of Polyelectrolyte Multilayers Deposited on Biodegradable Corona-Charged Substrates Used as Drug Delivery Systems. *Coatings*, 14(1), 85. Q1 – 25 т.
2. A Grigorov, A., Yovcheva, T., Iliev, I., Vlaeva, I., & Viraneva, A. (2022). Impact of physical and chemical modification on the immobilization of β -galactosidase in poly-lactic acid multilayer structures. *Bulg. Chem. Commun*, 54, 47-52. Q4 – 12 т.
3. Viraneva, A., Marudova, M., Grigorov, A., & Yovcheva, T. (2024). Benzylamine hydrochloride immobilization in multilayer structures based on lyophilized composite polylactic acid/poly (ϵ -caprolactone) substrates. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 59(4), 823-830. Q3 – 15 т.
4. Viraneva, A., Marudova, M., Grigorov, A., Milenkova, S., & Yovcheva, T. (2025). Multilayered Polyelectrolyte Structures Deposited on Corona-Charged Substrate Blends as Potential Drug Delivery Systems. *Coatings*, 15(2), 240. Q1 – 25т.

Участия в научни конференции:

- 9^{та} Международна конференция на ФМНС (FMNS-2021), Юни 2021, Благоевград, България.
- 10^{та} Юбилейна международна конференция на ФМНС (FMNS-2023), Юни 2023, Благоевград, България.
- 10^{та} Международна школа по физика на кондензираната материя (ISCMP): Предизвикателства в Наноразмерната Наука: Теория, Материали, Приложения, Септември 2022, Варна, България.
- 23^{та} Международна школа по физика на кондензираната материя (ISCMP), 25-30 август, 2024 г., Варна, България.

Участия в научно-изследователски и инфраструктурни проекти:

- Център за компетентност „Персонализирана иновативна медицина“ (ПЕРИМЕД) по Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ по процедура за предоставяне на безвъзмездна помощ BG05M2OP001-1.002-0005 C01 от 30.03.2018г., финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2023 г. и съфинансиран от Европейския съюз чрез Европейския фонд за регионално развитие –изследовател.
- Д24-ФТФ-009, ДУЕКОС: „ДИГИТАЛНИ УСТОЙЧИВИ СИСТЕМИ - технологични решения и социални модели за устойчивост на

екосистеми “ (ДУЕкоС) BG-RRP-2.004-0001-C01, Активни опаковки за удължаване на срока на годност на хранителни продукти, 2024-2026.

- МУ19-ФТФ-013, Изследване на модифицирани многослойни структури за имобилизиране на биологично активни молекули, Фонд „Научни изследвания“ при ПУ „Паисий Хилендарски“, 2019-2020
- ГТ-1/2020, Зелени технологии, Фонд „Научни изследвания“ при ПУ „Паисий Хилендарски“, 2020-2022 г..
- МУПД23-ФТФ-014, Изследване на полиелектролитни многослойни филми, отложени върху порьозни коронозаредени подложки от полимлечна киселина и полиепсilon капролактон, като лекарство доставящи системи, Научно-изследователски проект млади учени, докторанти и постдокторанти, Фонд „Научни изследвания“ при ПУ „Паисий Хилендарски“, 2023-2024 г.