

## Справка

за оригиналните научни приноси  
на доц. д-р Елена Василева  
за участие в конкурс за академична длъжност „професор“,  
професионално направление 4.2. Химически науки (Полимери)

В настоящия конкурс участвам с една глава в книга и 15 статии (7 Q1, 7 Q2, 1 Q3), 14 от които са публикувани в реферирани списания с импакт фактор. Всички тези статии, както и главата в книгата, са публикувани след 2008 г., когато заех академичната длъжност доцент, т.е. не са включени нито в докторската ми дисертация, нито в конкурса за доцент. За 11 от тези 15 статии съм автор за кореспонденция. Цитатите, с които участвам в конкурса са 68 (според Скопус, без автоцитати на всички автори) и са забелязани за статиите, с които участвам в конкурса. Сумарният импакт фактор на тези статии е 51.96, средният импакт фактор на статия е 3.46, а средната цитируемост на статия е 4.5.

Съ-автор съм на общо 48 статии и две глави в книги, като от тези 48 статии, 38 са публикувани в списания с импакт фактор. Върху тях са забелязани 716 цитати (според Скопус, без автоцитати на всички съавтори), h-индекса ми, без самоцитати, е 13.

В Таблицата по-долу е представено до колко представените документи в конкурса покриват изискванията на Факултета по химия и фармация, СУ“Св. Кл. Охридски“.

Група показатели	Съдържание	Професор (изисквания на ФХФ)	Реални показатели
А	Показател 1	50	50
Б	Показател 2	-	-
В	Показатели 3 или 4	100	110
Г	Сума от показателите от 5 до 10	220	245
Д	Сума от точките в показател 11	120	136
Е	Сума от показателите от 12 до 20	150	380
Ж	Сума от показателите от 21 до 25	120	270

Всички статии, включени в участието ми в конкурса, са с обща тематика: *Полимерни материали с приложение в медицината*. В тези работи са описани полимерни материали, създадени чрез прилагане на разнообразни подходи и методи за синтез на полимерни материали, с крайна цел, най-често свързана с проблеми, поставени от медицината. В зависимост от типа материали, които са докладвани в тях, статиите могат да бъдат разделени на три основни групи:

(а) посветени на полицивтерйонни хидрогелове (No 8, 9, 13, 16)

(б) посветени на взаимнопроникващи полимерни мрежи (No 2, 3, 4, 5, 6, 14,15)

(в) посветени на полимерни частици (No 1, 7, 10, 11, 12)

## ***I. Полицвитерйонни хидрогелове и техни биомедицински приложения***

(No 8, 9, 13, 16)

### *I.1. Полицвитерйонни хидрогелове като материали за превръзки за хронични рани*

(No 8, 9, 13)

Полицвитерйоните (ПЦЙ) са вече широко използвани като биоматериали, тъй като те притежават отлична био- и кръво-съвместимост, дължаща се на изключително ниската неспецифична адсорбция на протеини върху техните повърхности. В две последователни публикации (8 и 9), ние показахме, че специфичните свойства на ПЦЙ ги правят особено подходящи за материали за превръзки за хронични рани. Хроничните рани се отличават с: (а) повишена активност на матричните металопроотеинази (ММР), която води до разграждане на извънклетъчната матрица, както и на растежните фактори, способстващи зарастването на раната; (б) повишена активност на ензима миелопероксидаза (МРО), който играе важна роля в защитата на раната от бактерии, но продължителното му действие в раната води до трайно увреждане на тъканите и тяхната некроза; повишено рН на раната ~ 7.15–8.93, което има неблагоприятно въздействие върху тъканта на раната тъй като я лишава от кислород, а в същото време осигурява благоприятна среда за бактериален растеж; (г) често хроничните рани имат прекомерно производство на ексудат, който предизвиква свръххидратация на раната и прави кожата под превръзката по-податлива на увреждане. Освен това, ексудатът съдържа високи нива на вредни вещества, включително ензими, които могат да доведат до обелване на кожата; (д) влажната среда на хроничните рани ги прави силно податливи на бактериални инфекции, включително позволява образуването на биофилми, които допълнително усложняват и забавят заздравяването на хроничните рани.

В нашето изследване в статии 8 и 9 ние показахме за първи път приложението на полицвитерйонни мрежи (поли(сулфобетин метакрилатни) (ПСБ) в 8 и поли(карбоксибетаин метакрилатни) (ПКБ) в 9) като материали за направата на превръзки за *хронични* рани. Новоразработените хидрогелове, получени с помощта на омрежващ агент с етилен гликолни мономерни звена, а именно поли(етилен гликол) диакрилат (ПЕГДА), са изградени от двата типа полимери с най-ниска неспецифична протеинова адсорбция, което води до очаквана висока антибиофилм активност. Всички ПСБ и ПКБ хидрогелове демонстрират антибиофилм активност срещу *S. aureus*, една от най-често срещаните бактерии при хронични рани. Тяхната антибиофилм активност, заедно с не-адхезивните им свойства към тъкани, ги прави незалепващи за раната, а оттам и отлични кандидати като материали за превръзки за хронични рани. Нещо повече, ПСБ хидрогеловите демонстрират „интелигентно“ поведение (No 8): те показват линейна зависимост на тяхната степен на набъбване във вода от температурата в интервала между 20 и 70 °C. Те показват и антиполиелектролитно поведение, т.е. увеличават степента си на набъбване в присъствие на сол (NaCl), като в зависимост от степента им на омрежване, тяхната степен на набъбване нараства между 10 до 22 пъти, с нарастване на концентрацията на NaCl. Способност да откликват на промени на параметри на

биологичната среда показаха и ПКБ хидрогелове (No 9), като освен присъщата за ПЦЙ солева чувствителност те показаха и рН чувствителност на способността си да набъбват. Изследването ни (No 8 и 9), също така, демонстрира и силната способност на ПСБ и ПКБ да свързват вода - ~40% свързана вода бе определена за почти всички ПЦЙ хидрогелове, което се счита за основната причина за тяхната ултра-ниска неспецифична адсорбция на протеини. Благодарение на тези си свойства, ПЦЙ хидрогелове ефективно абсорбират и задържат в себе си раневия ексудат, като по този начин абсорбират и основните ензими (например МРО и ММР), съдържащи се в ексудата и причиняващи хронифициране на раните. ПЦЙ хидрогелове, в зависимост от тяхната степен на омрежване, абсорбират ~30–40% МРО, като в същото време, активността на МРО се запазва, т.е. ПЦЙ хидрогелове могат да намалят прекомерното количество МРО в хроничните рани, но в същото време не възпрепятстват ензимната активност, необходима за правилното заздравяване на раната. Доказано бе, че ПЦЙ хидрогелове не са цитотоксични (чрез *in vitro* изследвания), както и че околните тъкани имат добра поносимост от към тях (чрез *in vivo* изследвания). По този начин, ние демонстрирахме, предимствата на ПЦЙ хидрогелове като материали за направата на превръзки за хронични рани, а именно: (i) висока способност за абсорбиране на ексудат от рани; (ii) висока способност за свързване на вода; (iii) добър контрол върху концентрация на ензими в хроничните рани чрез абсорбция; (iv) без инхибиране на тяхната активност; (v) антибиофилм активност срещу обичайните за хроничните рани бактерии; (vi) нецитотоксичност и (vii) *in vivo* доказана много добра поносимост от околните тъкани.

Тези две наши изследвания показаха, че цвитерйонната функционалност води до значими и съществени биомедицински приложения на полимерите, които я притежават. Опитът, който натрупахме в областта на разработване на полицвитерйонни материали за направата на превръзки за хронични рани бе използван за създаване на един от първите обзори в областта на полицвитерйонни превръзки за рани, който излезе като глава в книга (No 13). Там, освен нашите собствени изследвания, ние направихме критично представяне на наличните през 2020 година (тогава бе подготвена главата) подобни изследвания за приложение на полицвитерйон-базирани материали за превръзки за рани (включително и акутни рани), като техния брой тогава не бе голям. В разработването на това приложение на ПЦЙ, нашите разработки са едни от първите в научната литература.

### *1.2. Полицвитерйонни хидрогелове за модифицирано освобождаване на лекарства*

(No 16)

В предишни работи, наши и на други автори, бе изяснена способността на ПСБ да образува физична мрежа чрез асоцииране на макромолекулите му в дипол-диполни кълстери. Тази физична мрежа определя в голяма степен свойствата му, включително затруднената му разтворимост във вода при стайна температура и съответно температурно-чувствителното му поведение. Това насочи интереса ни към създаването на негови съполимерни хидрогелове с полимер със силно изразена хидрофилност, какъвто е поли(винил пиролидона). Така синтезирахме за пръв път съполимерна мрежа на базата на сулфобетин метакрилат (СБ), винил пиролидон (ВП) и ПЕГДА (статия No 16). Три съполимерни мрежи с различен състав, както и чист ПСБ хидрогел, бяха изследвани като потенциални материали за получаване на меки контактни лещи, които да се използват за освобождаване на лекарственото вещество тимолол малеат (ТМ) в очите. Показахме, че състава на съполимерите влияе върху техния капацитет на

натоварване с ТМ, а именно съполимерите, богати на ВП мономерни звена, показват по-висок капацитет на натоварване с ТМ в сравнение с тези, богати на СБ мономерни звена. Очаквано, съставът на съполимера повлиява и профилите на освобождаване на ТМ: увеличаването на СБ мономерните звена води до по-бавно освобождаване на ТМ. Тези резултати се обясняват именно с физичната мрежа, образувана в съполимерната мрежа от СБ мономерните звена, която забавя освобождаването на ТМ, като ефектът е количествено зависим от съдържанието на СБ мономерните звена в полимера. Резултатите от изследването показват, че съполимерните мрежи на ПСБ/ПВП са подходящи материали за направата на меки контактни лещи и от гледна точка на тяхната пропускливост на светлина, като едновременно с това те осигуряват модифицирано освобождаване на ТМ в очите.

## **II. Взаимнопроникващи полимерни мрежи**

(No 2, 3, 4, 5, 6, 14, 15)

Подходът на взаимно проникващите полимерни мрежи (ВПМ) позволява включването в един полимерен материал на разнообразни полимери, всеки носещ определени свойства, които придава на получената ВПМ. Ето защо, този подход е широко приложим за създаване на функционални полимерни материали.

### *II.1. Взаимнопроникващи полимерни мрежи като лекарстводоставящи системи*

(No 3, 5, 6, 14)

ВПМ са особено подходящи за създаването на лекарстводоставящи системи специално пригодени към даденото лекарствено вещество. Затова в няколко наши публикации (No 3, 5 и 6) бяха разкрити предимствата, които подходът на ВПМ дава за тази цел. Синтезирани бяха две ВПМ със сходен състав, а именно - на поли(акрилова киселина) (ПАА) и полиакриламид (ПААМ) (No 3) и на ПААМ с поли(метакрилова киселина) (ПМАА) (No 5), като и двете мрежи бяха приложени като полимерен носител за удължено освобождаване на верапамил хидрохлорид (ВХХ). Чрез състава на ВПМ бе контролирана гъстотата на омрежване, за която е известно, че е ключов фактор за лекарственото освобождаване. От друга страна, подборът на компонентите на ВПМ бе направен така, че между натовареното лекарствено вещество и ВПМ да възникнат физични взаимодействия. Ефективността на този подход бе потвърден, от една страна, от повишаването на температурата на встъкляване на ВПМ след натоварването ѝ с ВХХ, а от друга страна, от аморфизирането на ВХХ след натоварването му във ВПМ (наблюдавани и за двете ВПМ, а именно ПАА/ПААМ и ПМАА/ПААМ). Доказано бе взаимодействие на ВХХ с ВПМ както чрез йонни, така и чрез водородни връзки (с всеки един от двата полимерни компонента на ВПМ ПМАА-ПААМ (No 5). Показано бе, че състава на съполимера (отношението между двата полимерни компонента във ВПМ) повлиява профилите на освобождаване на ВХХ, като и при двата типа ВПМ, съставите обогатени с ПААМ показват по-добър потенциал за забавено освобождаване на ВПМ. Така, бе направен извода, че функционалността на компонентите на ВПМ и тяхната густота на мрежата, определяща способността им да набъбват, повлияват както върху ефективността на натоварване, така и върху профилите на освобождаване на ВХХ.

Дифузията на ВХХ в двата типа ВПМ, а именно ПАА/ПААМ и ПМАА/ПААМ, се определя от природата на компонентите на ВПМ, както и от състава (съотношението

между двата компонента) на ВПМ (№ 6). Замяната на хидрофилния ПАА с по-хидрофобния ПМАА води до загуба на температурна чувствителност на ВПМ ПМАА/ПААМ в сравнение с ВПМ ПАА/ПААМ в изследваната температурна област. Освен това, двете ВПМ показват различен тип зависимост на степените си на набъбване от рН. Също така, дифузията на ВХХ във ВПМ ПАА/ПААМ се променя от аномална до Фикова дифузия с промяната в състава на ВПМ, т.е. с увеличаване на съдържанието на ПАА се намалява и горната критична температура на ВПМ, поради засиленото взаимодействие ВХХ-ПАА, както и поради промяна на вътрешната структура на ВПМ. За ВПМ на ПМАА/ПААМ не се наблюдава промяна в типа дифузия на ВХХ с промяна в техния състав, като тя остава Фикова. Така бе демонстрирано, че подходящият избор на компонентите на ВПМ, както и техния състав, може да бъдат използвани за контрол върху тяхната структура, свойства, а оттук и на техните характеристики като системи за доставяне на лекарства.

Използвайки отново ВПМ подходът, бе разработена нова система за модифицирано лекарствено освобождаване на диклофенак натрий (ДФН) (№ 14). Бяха синтезирани ВПМ на поли(N,N'-диметиламино етилметакрилат) (ПДМАЕМА) и ПААМ, за които бе наблюдавано фазово разделяне на нанометрично ниво. Съставът на ВПМ повлиява дифузията на водните молекули в нея поради забавената релаксация на полимерните вериги, определена от преплитанията на ВПМ. По този начин е доказано, че съставът на ВПМ ПДМАЕМА/ПААМ е начин да се променя структурата, а оттам и свойствата на тези нови материали. ВПМ ПДМАЕМА/ПААМ бяха успешно нативарени с ДФН, като състава на ВПМ не повлиява количеството на заредения диклофенак натрий. Натоварването на ДФН във ВПМ води до аморфизация на лекарството, както и до повишаване на температурата на встъпяване на ВПМ, ефект наблюдаван и при предишните наши изследвания, в резултат на взаимодействието полимер-лекарство. Профилите на освобождаване позволяват удължено освобождаване на ДФН от тези нови полимерни носители.

## *II.2. Взаимнопроникващи полимерни мрежи като матрици за създаване на полимерни композити* (№ 4)

Описаните в статия № 3 ВПМ на ПАА и ПААМ бяха приложени и като матрици в които чрез *in situ* утаяване на калциеви фосфати бяха получени полимерни композити. За целта бе използвана функционалността на ПАА - карбоксилатните аниони служат като места за координиране на калциеви йони, които след прибавяне на разтвора, съдържащ фосфатни аниони, стават зародиши и водят до формиране на калциеви фосфати. Това е първото изследване, в което именно ВПМ са използвани като матрици за утаяване на калциеви фосфати, в опит да се следва естествения процес на биоминерализация. Два ключови фактора контролират *in situ* отлагането на калциеви фосфати във ВПМ, а именно: функционалността на ВПМ, както и гъстотата на мрежата на ВПМ хидрогелове, т.е. същите които играят роля и за приложението на ВПМ като лекарство доставящи системи. Така, това изследване е първото, което разкрива потенциала на ВПМ като матрици за отлагане на калциеви фосфати, следвайки хода на естествения процес на биоминерализация. Това е друга линия на изследване, която обаче не е обширно включена в настоящия конкурс.

### II.3. Взаимнопроникващи полимерни мрежи като „интелигентни“ биоматериали (No 15)

Базирайки се на специфичните свойства на ПЦЙ, ние синтезирахме за първи път взаимнопроникваща мрежа (ВПМ) от ПСБ и ПКБ, която притежава способност да откликва едновременно на три „биологични“ външни стимула, а именно температура, рН и солева концентрация (статия No 15). Съчетаването в един материал едновременно на чувствителност към промяната на три параметъра на биологичната среда е рядко, тъй като обикновено тройно чувствителните материали реагират на „физични“ параметри като светлина, магнитно или електрично поле. Изследването ни демонстрира потенциала и гъвкавостта на ВПМ подхода като метод за създаване на интелигентни материали. Новосинтезираната ВПМ на ПКБ и ПСБ успешно наследява интелигентните свойства на двете съставни единични мрежи: ПКБ компонентът придава на новата ВПМ ПКБ/ПСБ рН чувствителност, както и биосъвместимост, демонстрирана чрез съизмеримата антибиофилм активност, нецитотоксичност и *in vivo* поведение – всички те са почти еднакви за ПКБ и за ВПМ на ПКБ и ПСБ, докато ПСБ е с по-ниски показатели на тези свойства. От друга страна, ПСБ мрежата придава температурна чувствителност на ВПМ ПКБ/ПСБ. И двата компонента, ПКБ и ПСБ, са чувствителни към солева концентрация, показвайки антиполиелектролитно поведение. Тяхната ВПМ, обаче, показва друг тип зависимост – степента на набъбване на ВПМ ПКБ/ПСБ нараства линейно с нарастване на солевата концентрация, докато двете съставни мрежи, ПКБ и ПСБ, показват криви на насищане за същата зависимост. Освен своите „интелигентни“ свойства, хидрогелът на ВПМ ПКБ/ПСБ проявява антибиофилм активност срещу често разпространени бактерии като *P. Aeruginosa*, *A. Baumannii* и *K. Pneumoniae*, не е цитотоксичен и притежава много добра *in vivo* биосъвместимост, което го прави уникален интелигентен материал, който може да намери много приложения в различни области, включително медицина, фармация, интелигентни материали за сензори и др.

### II.4. Взаимнопроникващи полимерни мрежи – охарактеризиране на взаимодействията между полимерните компоненти (No 2)

Изследването представлява опит за изясняване на причините, които стоят зад много добрите механични свойства, които притежава ВПМ на поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансулфонова киселина) (ПАМПС) и ПААМ. Използван е ядрено магнитен резонанс при въртене под магически ъгъл (HRMAS NMR) който дава възможност за получаване на подробна информация на молекулно ниво относно образуването на ковалентни връзки между двете полимерни мрежи както и на силни водородни връзки, базирани на N-H групата на ПАМПС като донор и C=O групата на ПААМ като акцептор. Тези изследвания изясняват защо хидрогелите на ВПМ на тези два полимера притежават значителна здравина и механични свойства, а именно благодарение на силните водородни връзки в тях.

## III. Полимерни частици (No 1, 7, 10, 11, 12)

Използвани бяха различни подходи за получаването на полимерни частици с различна големина, форма и структура, а именно ултразвуков (сонохимичен) метод за

получаване на протеинови капсули ((No 1 и 10); омрежване (химично и физично) на ПЦЙ (No 12); формиране на полиелектролитни комплекси, чиято форма и морфология бе варирана чрез концентрацията на изходните компоненти (No 11), както и полимерни частици с анизотропна форма, базирайки се на метод известен за нискомолекулни вещества и трансформиран от нас за получаване на полимерни частици (No 7).

### *III. 1. Протеинови частици, получени чрез ултразвук*

(No 1 и 10)

В една статия (No 10) и една обзорна статия (No 1) ние демонстрирахме приложението на протеини за направата на микро- и наночастици чрез ултразвуков (сонохимичен) метод. За първи път приложихме ултразвуковия метод като начин за получаване на желатинови капсули (ЖК) със среден размер между 200 и 400 nm. Бяха определени и параметрите, които повлияват размера на ЖК. Ниската концентрация на желатин и неговата денатурация водят до по-малки (в нанометричната област) размери, докато повишаването на температурата и времето за обработка с ултразвук води до увеличаване на размера на ЖК. Зависимостта на размера на ЖК от рН на разтвора преминава през минимум в изоелектричната точка на желатина. Широкото разпределение по размер на ЖК бе обяснено с широкото разпределение на молекулната маса на желатина. Потенциалът на ЖК като носители за лекарствени вещества бе демонстриран за две хидрофобни лекарства, а именно  $\alpha$ -токоферол и ацетилсалицилова киселина, което показва и гъвкавостта на сонохимичния метод за капсулиране на лекарства (течни и твърди). В обзора по темата (No 1) бяха описани и други протеинови частици, както и предимствата и недостатъците на сонохимичния метод за тяхното получаване.

### *III. 2. Полицивитерйонни частици, получени чрез химично и физично омрежване*

(No 12)

Разширявайки нашия опит в работата с ПЦЙ, и в частност с ПСБ, ние приложихме за пръв път ПСБ частици като система за освобождаване на ТМ в очите (No 12). За целта, ПСБ частици, формиращи чрез физична и химична мрежа, бяха синтезирани и детайлно охарактеризирани от гледна точка на тяхното „интелигентно“ поведение при промяна в температурата. ПСБ на базата на физично омрежване (PSB lin) притежават по-малък хидродинамичен диаметър и имат по-нисък зета потенциал в температурния диапазон за очно приложение, в сравнение с химично омрежените PSB NP, което доведе до по-висока ефективност на натоварване на ТМ в тях (около 30%), за разлика от PSB NP, които имат по-висок зета потенциал и ефективност на натоварване с ТМ ~23%. Профилите на освобождаване на ТМ в условия, имитиращи очно приложение, се подчиняват на кинетичен модел от първи порядък и за двата типа частици, като PSB NP показват профил на лекарствено освобождаване по-подходящ за очно приложение в сравнение с PSB Lin.

### *III. 3. Полиелектролитни частици с фибрило-подобна морфология*

(No 11)

Друг подход за формиране на полимерни частици, а именно полиелектролитните комплекси (ПЕК), бе използван за получаване на частици от хитозан (Chi) и алгинат (Alg) (No 11). Изследването бе първият опит за прилагане на Chi/Alg ПЕК за модифицирано

освобождаване на диклофенак натрий (ДФН). Получената фибрилоподобна морфология на формираните ПЕК е използвана за осъществяване на контрол върху профила на освобождаване на ДФН. Чрез промяна в състава на фибрило-подобните Chi/Alg ПЕК е направен опит за контрол и върху техните свойства. Установено бе, че богатите на хитозан ПЕК фибрили имат по-висок  $\zeta$  потенциал, което води до аморфизиране на натварения в тях ДФН, както и до дифузионно контролирано освобождаване на лекарството в сравнение с ПЕК, където двата компонента са в съотношение 1:1, или за тези които са богати на алгинат, за които се наблюдава не-Фикова дифузия на ДФН. Съставът на ПЕК повлиява  $\zeta$  потенциала, ефективността на натварване на ДФН, както и неговата кристалност в натварения ПЕК. Като най-успешна система за удължено освобождаване на ДФН бе определена ПЕК със състав хитозан:алгинат 1:1, която осигурява около 87% ефективност на зареждане с ДФН, демонстрира почти линейно освобождаване на ДФН през първите 8 часа и около 90% от зареденото лекарство се освобождава в рамките на 24 ч. По този начин бе демонстриран потенциала на фибрилните ПЕК на хитозана и алгината като система за удължено освобождаване на ДФН.

### *III. 4. Полимерни частици с анизотропна форма*

(No 7)

Въведохме нов “bottom-up” метод за синтез на полимерни частици с различни анизотропни форми, използвайки известен в литературата метод за контрол върху формата на капки от нискомолекулни съединения (No 7). За целта, капки от хидрофобни мономери бяха оформени в желани форми посредством подходящ подбор на повърхностно активни вещества и скорост на охлаждане и полимеризирани с UV-лъчение за трайно фиксиране на анизотропната форма. Очертахме факторите, които контролират получаването на различни форми (повърхностноактивно вещество, първоначален размер на капката и време/скорост на охлаждане). Бяха получени полимерни частици с шестоъгълна и триъгълна форма, както и нишки от тях, изхождайки от капки на техните мономери с големина от 50 nm до 1  $\mu$ m в поне едно от техните измерения. Бяха получени и полимерни композитни частици чрез включване на напр. магнитни наночастици в мономерните капки и чрез добавяне на омрежващ агент в същите капки бяха получени стабилни полимерно-композитни частици.