

Лична справка за приносния характер на трудовете

на доц. дн Константин Тодоров Балашев

Изследванията са в областта на физикохимията и биофизикохимията на повърхностите и дисперсните системи и са групирани в три направления:

- I. Атомно-силова микроскопия (AFM) и използването ѝ като експериментална техника за изследване на организацията на мономолекулни слоеве, молекулни филми, биологични мембрани и структури, ензимо-каталитични реакции и при охарактеризиране с нанометрична разделителна способност на наночастици, наноструктури и различни материали.
- II. Изследване на моделни монослойни системи на граничната повърхност вода/въздух с помощта на рентгенова дифракция от източник на синхротронно лъчение (GIXD) и пълно вътрешно отражение на рентгеново лъчение (XR).
- III. Физикохимични и фотохимични свойства на моно- и мултислойни молекулни системи (монослоеви, бислойни моделни мембрани и липозоми), организирани на гранични повърхности.

Приносите в тези направления са представени в 55 научни труда (цитатите по-долу отговарят на списъка с публикации, представен за участие в конкурса).

- Приложение на Атомно-силовата микроскопия при изследване на молекулната организация в Лангмюир-Блоджет (LB) филми от амфифилни съединения. [A1, B3, B10, B19, B27, B33]

Атомно-силовата микроскопия (AFM), известна още като Сканираща силова микроскопия (SFM), тридесет години след изобретяването ѝ се усъвършенства като експериментална техника и понастоящем представлява един от най-мощните инструменти за наблюдаване, „снимане” и охарактеризиране с нанометрична разделителна способност на топографията (релефа) на различни повърхности. Резултатите, публикувани в [B33], са принос за утвърждаване предимствата на AFM при охарактеризиране топографията, физикохимичното състояние и молекулната подредба в LB филми от новосинтезирани амфифилни съединения – хексабензокоронени (HBC), с потенциални приложения в молекулната електроника. Изследвани са организирани в монослой HBC молекули от клас амфифилни съединения чрез метода на AFM в комбинация с Келвинова силова

микроскопия (KFM), рентгеноструктурния анализ – GIXD и XR, и е доказано, че тези молекули се самоорганизируют на границата вода/въздух в различни ламеларни фази в зависимост от стойността на повърхностното налягане, като при по-ниските му стойности в монослоя се образуват добре дефинирани π -стекове, подредени под наклон на принципа на доминото, докато при по-високо повърхностно налягане НВС монослоят търпи фазов преход, при който въглеродородните вериги преминават в 2D кристално състояние и се загубва последователността в π -стека, което води до измерими промени в електронните свойства на молекулния филм. Развитите в [B33] идеи и получените резултати са с принос при изследване анизотропията и оптичните свойства на НВС филми, при изследването и теоретичната интерпретация на електронната делокализация в течно-кристални структури и др.

Друг принос в приложението на AFM за охарактеризиране на наноструктурата на мономолекулни филми е при визуализиране морфологията и структурната организация на LB филми от протеина хидрофобин (HFBI) [B19]. С помощта на AFM, в комбинация с реологични измервания, е доказано преференциалното образуване на монослойни или трислойни покрития от HFBI върху твърда слюдена повърхност. От получените AFM изображения са установени два типа повърхностни структури от HFBI, които са образувани вследствие на различните молекулни механизми при компресията на монослоя от HFBI на границата вода/въздух.

С помощта на AFM в [B10] е изследвана конкурентната адсорбция на серумен албумин (BSA) и n-dodecyl-maltoside ($C_{12}G_2$) на границата вода/въздух. Чрез AFM изображения на LB филми от изследваните системи е показано, че чистият BSA при адсорбцията си на граничната повърхност формира нехомогенен монослой с дебелина между 3.5–4.0 nm. Данните от AFM изображенията на смесените адсорбционни слоеве показват, че при съотношение $BSA:C_{12}G_2 = 1:7.5$ адсорбцията на BSA молекули е доминираща, докато при съотношенията $BSA:C_{12}G_2 = 1:50$ или $1:100$ доминираща е адсорбцията на $C_{12}G_2$.

Принос в приложението на AFM за изследване на молекулната организация на LB филми е демонстрирана и при изследването на действието на Savinase върху монослой от инсулин [B27], където са предложени два експериментални подхода: чрез измерване на намаляването на повърхностната площ и потенциал по време на ензимната реакция, протичаща на граничната повърхност вода/въздух, и чрез AFM изображения на

състоянието на монослоя. От AFM снимки на LB филми от инсулин са получени данни за структурата на инсулиновия монослой, в частност на разположението и ориентацията на А- и В-полипептидните вериги на инсулина на граничната повърхност вода/въздух при различни повърхностни налягания. AFM снимките на LB филми, прехвърлени преди и след действието на протеазата – Savinase върху инсулиновия монослой, показват съществени различия в морфологията на тези филми. Преди ензимното действие филмите са сравнително гладки, а след хидролитичното действие на ензима грападостта им се увеличава двойно и се наблюдава наличието на 3D молекулни структури от хидролизирани В-вериги на инсулиновата молекула.

AFM е използван и при анализа на морфологията на LB филми, получени от монослоеве на фосфолипидни смеси, с цел да се изучи природата на взаимодействие между ензима фосфолипаза А₂ (PLA₂) и неговия липиден субстрат, организиран в големи униламеларни липозоми [B3].

- Приложения на Атомно-силовата микроскопия при изследване на ензимо-каталитични реакции.[A1, B24, B26, B28, B29, B32, B34, B37, C1, D7]

Основната стъпка за прилагането на AFM като експериментална техника за изследване на биологични среди и обекти е направена през 1991 г., когато Р. Hansma и сътрудниците му показват, че е възможно сканирането на повърхности в течна среда. С откритието на „течната клетка“ (*liquid cell*) на AFM се поставя началото на изследвания в областта на биологията, при които биологичните обекти могат да се наблюдават в условията на среда, чиито свойства могат да се контролират, например промяна на рН, йонния състав на средата и пр. Нещо повече, това откритие позволява да се наблюдава на нанометрично ниво протичането на биологични процеси, като по настъпващите промени в структурата и молекулната организация на биологичните обекти да се анализира кинетиката на процесите. В това отношение в [B34, B37, D7] за пръв път е показано как AFM може да се приложи като аналитична методика за изследване на ензимо-каталитични реакции, както и да се даде отговор на важни въпроси, касаещи организацията на участващите в биохимичните реакции молекули. Предложеният експериментален подход се заключава в следното. Върху твърда подложка (слюдена, силициева пластинка и др.) се формира молекулен филм (бислой, мултислой) с помощта на класическа методика (например, LB метода). След това филмът се поставя в течната клетка на AFM. С помощта на спринцовка в течната клетка се инжектира разтвор с желано съдържание на

биологичноактивни молекули, ензими, хормони и пр., рН, йонен състав и т. н. Преди и след инжектирането с помощта на АФМ се сканира повърхността на филма и се получава поредица от снимки. Впоследствие тези снимки се анализират, като се следят размерът и еволюцията на дефекти във молекулните филми, промените в топографията, грападостта и пр. На тази база се разработва съответният кинетичен модел, адекватно описващ хода на процеса.

- (i) *Изследване на хидролизата на фосфолипидни мембрани под каталитичното действие на фосфолипаза А₂ (PLA₂). [A1, B28, B29, B32, B34, B37]*

Фосфолипаза А₂ е ензим, който специфично разпознава *sn-2* – естерната връзка при фосфолипидите, каталитично я хидролизира и в резултат на реакцията се получават като продукти лизофосфолипиди и карбоксикиселини. Изследването на тази ензимо-каталитична реакция има много аспекти – каталитичен механизъм, природа на така наречения латентен период на реакцията, организация и състав на субстрата на реакцията и пр. За пръв път като експериментална техника АФМ дава отговор на някои от тези съществени въпроси [A1]. Така например в [B32] за пръв път е разгледано влиянието на продуктите на реакцията в процеса на фазообразуване и хидролиза на моделни бислойни мембрани. С АФМ е анализирана топографията (релефът) на бислоеве с различна начална концентрация на лизопродуктите. В липидните мембрани са установени вдлъбнати области, наречени продуктни дефекти, които са показател за фазово разделяне. Лизопродуктните фазови области са местата, от които се инициира ензимната хидролиза на мембраната. На нанометрично ниво е анализирана кинетиката на нарастване на отделни дефекти в бислоя и количествено е показана разликата в скоростта на хидролиза при дефектите, които са резултат на агрегация на продуктите и при други структурни дефекти в мембраната. За пръв път чрез АФМ е показано, че фосфолипаза А₂ „предпочита” продуктните дефекти пред структурните. Получените съществени резултати в [B32] и направените заключения са потвърдени с помощта на друга експериментална техника – Раманова микроскопия.

- (ii) *Изследване на хидролизата на липидни слоеве под каталитичното действие на *Humicola Lanuginosa* липаза (HLL). [A1, B31]*

Липазите са група от структурно добре изучени ензими, участващи в разграждането на мазнините (липидите) и чиято активност зависи силно от молекулната организация на липидните молекули. В [B31] за пръв път са използвани предимствата на АФМ като

експериментална техника както като инструмент за визуализация, така и като аналитична техника за изследване на процеса на липолитично разграждане на моделни биологични мембрани. С AFM е изследвано липолитичното действие на HLL върху хибридни липид/фосфолипид Дипалмитоилфосфатидил (DPPC)/Моноолеилглицерол (MOG) (MOG/ DPPC) бислоеве при три ензимни концентрации. От получените експериментални резултати са направени важни изводи за механизма на каталитично действие на *Humicola Lanuginosa* липаза (HLL) и физикохимичните процеси, протичащи на молекулно ниво, като например „предпочитаните” места за ензимна атака, механизъм на инхибиране на липазата и пр. По-конкретно, установено е, че скоростта на хидролиза зависи пропорционално на концентрацията на ензима, а също така и от дължината на периметъра на първоначалните структурни дефекти в бислоеве. Анализът на AFM изображенията показва, че ръбовете на съществуващите дефекти в хибридните бислоеве са предпочитаните места за ензимна атака. Установено е, че ензимните молекули не са локализирани по ръба на дефекта една до друга, на принципа „рамо до рамо“. Тези молекулни представи бяха по-късно потвърдени с помощта на други съвременни методи за анализ (конфокална микроскопия).

(iii) *Изследване на хидролизата на липидни слоеве под съвместното каталитичното действие на фосфолипаза A₂ (PLA₂) и Humicola Lanuginosa липаза (HLL).* [A1, B28]

В [B28] е използвана LB методиката за получаване на смесени Дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC)/Дипалмитоилглицерол (DPG) бислоеве, като субстрати за каталитичното действие на фосфолипаза A₂ (PLA₂) и *Humicola Lanuginosa* липаза (HLL), съответно. С помощта на AFM са получени и анализирани снимки на повърхността на бислоя преди и в хода на хидролизния процес. Анализът на кинетичните данни, получени от AFM изображения, показва, че когато двата ензима са в течната клетка на AFM, първоначално PLA₂ само частично хидролизира смесените DPPC/DPG бислоеве, а след това ензимната активност рязко нараства в резултат на включването на HLL в каталитичния акт.

(iv) *Изследване на хидролизата на фосфолипидни бислоеве под действие на Viroxin PLA₂.* [A1, B24, C1]

В [B24] с AFM е изследвано действието на viroxin PLA₂ при хидролиза на бислоеве от DPPC, като в хода на ензимната реакция са получени последователности от изображения, позволяващи да се проследят появата и еволюцията на бислойни дефекти.

Анализирани са периметърът и площта на индивидуалните дефекти, техните топографски характеристики, а оттам и кинетиката на ензимната реакция. На AFM снимките се наблюдават и появата и растежът на уникални триизмерни (3D) кристалоподобни структури, чийто размер и промяна в хода на реакцията са анализирани.

(v) *Изследване на протеолитичното действие на ензима Savinase.* [A1, B26]

Принос към класически монослойни изследвания на ензимни реакции, протичащи в монослой на граничната повърхност вода/въздух, е предложението в [B26] нов експериментален подход с AFM за изследване протеолитичното действие на ензима Savinase върху монослой от BSA, нанесен на границата вода/въздух или адсорбиран върху слюдена подложка, като и в двата експериментални подхода е оценена и сравнена каталитичната константа (TON) на ензимната реакция.

• Приложения на Атомно-силовата микроскопия при изследване морфологията на наночастици, наноструктури и при кинетиката на растеж на златни наночастици. [A1, B1, B2, B4, B8, B11, B12, B13, B15, B16, B17, B18, B20, D2, D3, D5, D6]

(i) *Приложения при изследване на метални наночастици.* [A1, B1, B4, B8, B11, B15, D2, D5, D6]

С AFM за пръв път е предложен експериментален подход [B11, D5] за охарактеризиране размера и формата на златни наночастици в хода на синтеза им и е изследвана кинетиката на растежа им. От получените AFM изображения в хода на синтеза на частиците са определени диаметрите им и след това са получени кинетични криви, интерпретирани с популярен в литературата кинетичен модел на Finke и Watzky. За валидация на метода, резултатите с AFM са сравнени с други два широко приложими метода – TEM и DLS, с което са потвърдени предимствата на AFM. Този експериментален подход е успешно приложен и при изследване влиянието на метални (Cu^{2+} и Eu^{3+}) йони върху кинетиката на растеж на златни наночастици [B1, D6] и при модификацията на частиците с BSA [B8].

В [B15, D2] с AFM в комбинация с EDS и XRD е анализирана структурата на филми от ZnO, модифицирани със златни наночастици, като е установено, че наличието на златните частици във филмите подобрява фотокаталитичната им активност. Подобни резултати за подобрене на фотокаталитичната активност са получени и за филми от TiO_2 с вградени в него златни наночастици [B4].

- (ii) *Приложения при изследване структурата на полимерни наночастици, наноструктури и липозоми.* [A1, B2, B12, B13, B16, B17, B18, B20, D3]

В [B2, B17, B18, B20] е предложен надежден експериментален подход с приложение на AFM за охарактеризиране размера и морфологията на полимерни наночастици. Изследвани са наночастици, синтезирани на основа на полимери Poly(VA-ко-DMAPS) с различни размери и структура в зависимост от молното отношение на мономерите VA/DMAPS. С помощта на AFM са демонстрирани морфологичните промени, настъпващи в тези наночастици, когато се натоварят с водоразтворим кардиоселективен β -блокер, Metoprolol tartrate. С AFM в [B12, D3] е изследвана и структурната организация на сегментирани съ-полимерни мрежи (SCN) на основата на poly(2-ethyl-2-oxazoline) и съдържащи 2-hydroxyethyl methacrylate, като потенциални системи за забавено освобождаване на Metoprolol Tartrate. В [B13] с AFM е изследвана морфологията на полимерни-,отпечатано“ наночастици за селективната сорбция на Hg (II) йони.

Липозоми са сферични везикули, изградени от бислойна фосфолипидна мембрана, като от практико- приложна гледна точка липозомните суспензии са широко използвани в медицината, фармацевцията и козметиката, като лекарствени агенти, носители на ензими, на антитела, на генетичен материал и др. В [B16] е предложен експериментален подход с AFM за изследване структурата на стерично стабилизирани липозоми.

- Приложения на Атомно-силовата микроскопия при изследване морфологията на биологични структури. [B6, B9, B14, B22, B23]

- (i) *Приложения при изследване структурата на хроматин от дрожди.* [B9, B22, B23]

С помощта на AFM изображения в [B9, B22, B23] е доказано, че линкерният хистон, кодиран от Hho1p гена на *S. Cerevisiae*, играе важна роля за високия порядък на организация и структурната цялост на хроматина при дрождите. Приложен е експериментален подход, при който са получени AFM изображения на хроматин от див (WT) и мутантен (HNO1 KO) тип *S. Cerevisiae*. Сравнението и количественият анализ на изображенията показват съществени структурни различия при мутантния тип хроматин, свързани с липсата на свързващия хистон.

- (ii) *Приложения за изследване структурата на фотосинтетичния апарат при растения.* [B6, B14]

При изследване на влиянието на рН върху макроорганизация и термичната стабилност на фотосинтетичния комплекс (PSII) на грана мембрани, AFM е използван за получаване на изображения с нанометрична разделителна способност на мембранни фрагменти в протонирано и частично депротонирано състояние [B6]. С AFM също така е изследвана и промяната в молекулната архитектура и функция на мембрани от фотосинтезния комплекс на *Arabidopsis* под действието на растителни стероидни хормони (BRS), като е доказано тяхното положително влияние върху процеса на фотосинтеза [B14].

- Приложения на AFM при изследване наноструктурата на различни материали. [B5, B7, B21, D1, D4]

AFM успешно е приложена:

- (i) при изследване на топографията на модифицирани покрития от TiO_2 или TiO_2/ZnO , като са установени корелации на морфологията с трибологичните свойства на изследваните филми [B5, D1, D4];
 - (ii) при охарактеризиране на функционални хибридни оптични композити [B7];
 - (iii) в микроелектронните технологии за изследване на свойствата на повърхностите на контактни площадки на интегрални схеми [B21].
- Изследване на моделни монослойни системи на граничната повърхност вода/въздух с помощта на рентгенова дифракция от източник на синхротронно лъчение (Grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) и пълно вътрешно отражение на рентгеново лъчение (XR). [A1, B30, B33, B35, B36, D8, D9, D10]

Рентгеновата дифракция (GIXD-XR) от монослоеве на граничната повърхност вода/въздух е двуменсионален (2D) кристалографски метод, чрез който се получава важна информация за молекулната подредба в монослоя, разпределение на електронната плътност, площ на молекула и т. н.

В [B35, D8, D9, D10] са изследвани липид-липазни взаимодействия на граничната повърхност вода/въздух. За пръв път с методиката като моделни системи са изследвани монослоеве от два класа липиди – с наситени (дипалмитоилглицерол (DPG) и ненаситени (моноолеоилглицерол (MOG) въглеродородни вериги, без и в присъствие на *Humicola Lanuginosa* липаза (HLL). Измерена е електронната плътност на слоя преди и след инжектиране на липазата във водната фаза. По получената електронна плътност, измерена 2.5 минути след инкубацията на слоя с липазата, е изчислена дебелина на слоя

$\approx 80 \text{ \AA}$. Установена е 2D кристалната решетка на монослоя преди и след адсорбцията на ензима.

В [B36], използвайки GIXD-XR в комбинация с молекулно-динамични симулации, е изследвана за пръв път адсорбцията на *Humicola Lanuginosa* липаза (*HLL*) на граничната повърхност вода/въздух. Изследвано е и взаимодействието на липазата с моделни монослоеве от липиди. Изследван е механизмът на активация на *HLL*, като за сравнение с експерименталните данни от GIXD-XR е приложена симулационната методика Молекулна динамика (MD), с чиято помощ може да се изследва динамичното поведение на молекули и тяхното обкръжение. От GIXD-XR е получен профилът на електронната плътност на *HLL* слоя на граничната повърхност вода/въздух. Установено е, че съвпада с теоретично получения с помощта на MD метода. Установена е двумерна хексагонална опаковка на липазния монослой с параметър на кристалната решетка $a = 53 \text{ \AA}$.

В [B33] е изследвана молекулната структура на монослоеве от хексабензокоронени при различна плътност на монослоя. С помощта на GIXD-XR са установени 2D кристалната структура и дебелината на монослоя при три различни стойности на повърхностното налягане.

В [B30] с помощта на XR като експериментална методика количествено е изследван хидрофобният ефект, като за пръв път е дадено доказателство за „съхнене” (dewetting) на хидрофобна повърхност при контакт с водната фаза. За целта е изследвана 2D кристалната структура на монослой от n-алкани $C_{36}H_{74}$. Експерименталните данни са сравнени с данни от MD симулации. Изключителната важност на резултатите, получени в [B30], се потвърждава от високата цитируемост на работата (>150 цитата).

- Физикохимични и фотохимични свойства на моно- и мултислойни молекулни системи (монослоеве, бислойни моделни мембрани и липозоми), организирани на гранични повърхности. [B25, B38, B39, B40, B41, B42, B43, B44]

(i) *Изследване фазови преходи в мономолекулни слоеве.* [B25]

С помощта на флуоресцентна микроскопия (FM), адаптирана към Лангмюирова везна, и измервания на повърхностния потенциал на границата вода/въздух в [B25] е изследвана природата на фазовия преход G/LE във фосфолипидни монослоеве от DPPC, като от теоретичния подход на MacConnell и Meunier е определяна стойността на линейното напрежение λ по линията на контакта между двете фази.

(ii) *Изследване на кинетиката на разграждане на униламеларни липозоми на граничната повърхност вода/въздух. [B44]*

В [B44] е изследвана и показана ролята на фазовия преход LC/C в бислой, изграден от фосфолипидни молекули (DMPC). Използвани са експериментални техники за измерване на повърхностното налягане и AFM. Наблюдаваните и теоретично описани промени в скоростта на разграждане на липозомите, при температури под и над фазовия преход, впоследствие са използвани при разглеждането и интерпретацията на различни биологични и фармакологични процеси. Така например, описаните и докладвани в [B44] резултати са спомогнали да бъдат анализирани процесите на вграждане на имуноглобулин G (IgG) в гликолипиден монослой, при анализа на процесите на формиране на моно- и бислойни пенни филми, при изследване ролята на липидния полиморфизъм при белодробно-сърфактантния цикъл, при процесите на сливане на липозоми и др.

(iii) *Изследване на състоянието и фотохимичните свойства на монослоеве от β -дикарбонилни и спиропиранови съединения, организирани на гранични повърхности. [B38-B44]*

В [B41, B43] са представени резултатите от изследването на монослоеве от β -дикарбонилни полимери – полиакрилатетон (РАА) и полиетилакрилоилацетат (РЕАА), с различно съдържание на енолната форма (РАА – 96%; РЕАА – 30%). Изследвано е влиянието на фазовата граница, рН и присъствието на двувалентни йони във водната фаза, върху организацията на мономерните звена на граничната повърхност, върху механичните (реологични) и електричните свойства на монослоеве от тези полимери. Установен е фазов преход с наличие на тримерни структури, чието образуване е благоприятствано от по-голямото съдържание на енолни форми. Развитите в [B41] идеи и получените резултати са използвани, за да се изследват свойствата на смесени монослоеве от димерни сърфактанти/ДНК, смесени монослоеве от едно- и двуверижни сърфактанти, при сравнителното изследване свойствата на граничните повърхности дихлорометан/вода и вода/въздух и др.

В [B38, B40] са изследвани механизмът и кинетиката на енол-кетонната тавтомеризация при облъчване с UV монохроматична светлина на монослоеве от β -дикарбонилни полимери. От експерименталните криви на изменение на повърхностната площ на монослоя във времето е развит кинетичен модел, от който е определена скоростната константа на реакцията на енол-кетонна тавтомеризация, организирана на

граничната повърхност вода/въздух. Определено е и нарастването на парциалната площ на едно мономерно звено в хода на химичната реакция. Развитите в [B38, B40] идеи и резултати са използвани при теоретичното изследване на магнитните свойства на LB филми от фоточувствителни радикали, за получаване с фотолитографска методика на полимерен фоточувствителен хидрогел и др.

В [B42] са изследвани механизмът и кинетиката на изомеризация на октадецилбензоспиропиран до мероцианин в смесен монослой с октадеканол. Развит е теоретичен модел за изследване на разпространението на фотоиндуцираната локална пертурбация на повърхностното налягане по протежение на монослоя. Следвайки експерименталния подход, в [B42] е разработен метод за контрол на конформацията на протеинов (β -казеинов) монослой под действие на светлината, изследван е електронният пренос в хода на фотофрагментарна реакция и др.

В [B39] е изследван ефектът на фотоиндуциран конформационен преход между затворената и отворената форма на хексабензилспиропиран чрез измервания на проводимостта на биологични липидни мембрани (БЛМ). Използвана е *patch clamp* методиката за получаване и измерване на проводимостта на моделните липидни мембрани. Важността на проведеното изследване може да се разглежда в две направления. Първо, избраната молекулна система моделира възможните фотоефекти в природните фотоактивни клетъчни мембрани. Второ, изучената моделна мембранна система има потенциално приложение в течно-кристалната нанотехнология и би могла да се разглежда като прототип на молекулно-самоорганизиращи фотоелектрични устройства.

14.04.2016 г.

Изготвил :

(доц. дн К. Т. Балашев)