

СПРАВКА ЗА ОРИГИНАЛНИТЕ НАУЧНИ ПРИНОСИ**на гл. ас. д-р Иван Любомиров Минков**

представена за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ по професионално направление 4.2. Химически науки (Физикохимия), обявен в ДВ, бр. 64 от 30.07.2024 г.

Кандидатът е съавтор на 32 научни публикации, от които 25 са в списания, реферирани и индексирани в световните бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus; 13 публикации – Q1; 7 публикации – Q2; 2 публикации – Q3; 1 публикация – Q4) и 9 публикации в български списания без импакт фактор и импакт ранг. В конкурса за доцент, кандидатът участва с 15 научни публикации. Към момента на подаване на документите за участие в конкурса са забелязани 81 цитата (реферирани и индексирани в Scopus и Web of Science), h факторът е 6. Научните резултати са представени в общо 18 устни доклади и постерни съобщения на национални и международни форуми.

Представените научни трудове са в областта на физикохимията и биофизикохимията на повърхностите и дисперсните системи. Могат да бъдат систематизирани в следните научно-приложни направления:

- ❖ Моделни изследвания на кинетиката на реорганизация и свойствата на иновативни нано- и микроразмерни системи за пренос на биологично активни вещества, нанесени върху фазови граници.
- ❖ Моделни изследвания на кинетиката на адсорбция/десорбция на различни йони и повърхностно активни молекули върху фазови граници.
- ❖ Моделни изследвания на кинетиката на осмотични процеси в условията на постоянен или променлив обем.

I. Приноси свързани с моделни изследвания на кинетиката на реорганизация и свойствата на иновативни нано- и микроразмерни системи за пренос на биологично активни вещества, нанесени върху гранични повърхности (публикации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 18, 20, 26, 28, 29).

През последните десетилетия постоянно нарастват усилията за разработване и внедряване на разнообразни по състав нано- и микроразмерни системи с биомедицинска насоченост. Развитието на материалознанието и насочения синтез на разнообразни биосъвместими молекули води до експоненциален ръст в броя на новополучените материали. Част от новополучените продукти под формата на дисперсии, суспензии, прахообразни и т.н. смеси, притежават потенциална възможност да бъдат използвани в практиката. Например лекарства, които трудно могат да бъдат директно въведени в организма поради тяхната хидрофобност и съответно ниска разтворимост във вода, могат да бъдат пренесени до клетките чрез посредници, преносители. Естествена междинна стъпка по пътя от синтеза на дадена молекула до прилагането ѝ в практиката под формата на краен продукт е лабораторното изследване на нейни основни физикохимични свойства. Поведението на една потенциална система за пренос на хидрофобни лекарства на фазова граница въздух/вода представлява класическа моделна система, чрез която да бъде направена *in-vitro* оценка на свойствата ѝ. Получената информация за кинетиката на разтичане по повърхността, както и свойствата на образувания повърхностен филм дават ценна информация за частиците преносители.

I.1. Поведение и свойства на липидни нанокapsули (LNC), нанесени върху гранична повърхност вода/въздух (W/A) (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18, 20)

Липидни нанокapsули (LNC) с различно съдържание на фосфолипидни молекули са получени във водни дисперсии и са охарактеризирани по размери и зета потенциали. След приготвянето на дисперсиите е установено наличието на две популации от нанокapsули, нестабилни (LNC I) и стабилни (LNC II). Направена е оценка на процентното съотношение между двете популации във всички изследвани проби. Кинетиката на образуване на повърхностен филм в резултат от реорганизацията на нестабилните (LNC I) нанокapsули след нанасянето им върху граничната повърхност вода/въздух е експериментално проследена чрез измерване на повърхностното налягане (π) и ΔV потенциала. Развит е кинетичен модел, добре описващ експериментално получените данни. В модела се отчитат поредица от процеси, протичащи върху фазовата граница вода/въздух след нанасянето на дисперсията: дестабилизация и разрушаване на LNC I; разтичане на съставлящите ги компоненти върху повърхността и образуването на монослой от Labrafac[®]; дифузия на стабилните LNC II от подповърхността към водния обем; освобождаване на единични молекули Solutol[®] от повърхността на двете популации нанокapsули и вграждането им във формиращия слой от Labrafac[®], водещо до образуване на смесен слой; отчетена е също така разтворимостта на молекулите Solutol[®]. Сравнението на експерименталните резултати с получените теоретични изрази даде възможност за пресмятане и получаване на различни количествени оценки. Получени са

числени стойности за кинетичните константи от приложения теоретичен модел и са направени сравнения за поведението на всички изследвани LNC дисперсии. Направена е оценка на влиянието на вида и количеството на фосфолипидите върху стабилността на изследваните проби (2, 3, 4, 9, 18, 20).

Изследвани са състоянието, електричните и дилатационните свойства на моделни монослоеове от трите отделни компонента изграждащи липидните нанокapsули – Labrafac[®], Solutol[®] и Lipoid[®], както и техни смеси (5). Направена е оценка за състава на смесения слой, образуван на повърхността след дестабилизацията и разрушаването на LNC (4, 5). Сравнението между свойствата на повърхностните филми, образувани от LNC, с тези на моделните монослоеове, потвърждава идеята, развита в кинетичното изследване, че повърхностните филми, образувани след бързото разпадане на нестабилната фракция нанокapsули (LNCl), съдържат основно Labrafac[®] и Solutol[®]. Установена е моларната част на Labrafac[®] в образувания смесен слой Lab/Sol.

Изследвана е кинетиката на образуване на повърхностен филм при реорганизацията на липидните нанокapsули при адсорбцията им от обема върху плоска, вдлъбната и изпъкнала повърхност вода/въздух (8). Чрез съпоставяне на теоретичните изрази с експерименталните данни са получени съответните кинетични константи, които са близки и за трите различни кривини на изследваната повърхност, както и до стойностите получени в случая, когато LNC са нанесени директно на повърхността, което потвърждава хипотезата, че начинът на доставяне на капсулите и кривината на фазовата граница не влияят върху механизма на тяхната дестабилизация и образуване на повърхностен филм (8).

Изследвано е действието на два хидролитични ензима *humicola lanuginosa* липаза (HLL) и панкреатична фосфолипаза A₂ (PLA₂) върху монослоеове, образувани при дестабилизацията на LNC, дестабилизация на малки униламеларни липозоми (SUV), получени от диолеилфосфатидилхолин (DOPC), както и моделни монослоеове, съдържащи компонентите Labrafac[®], Solutol[®] и Lipoid[®] (6, 7). Предложени са кинетични модели, описващи хидролизата и заедно с експерименталните резултати са получени повърхностните концентрации на субстратите, продуктите на хидролизата и стойностите на глобалните кинетични константи. Сравнението между глобалните кинетични константи в случай на хидролиза на HLL на чисти монослоеове Labrafac[®], Solutol[®] и тези на моделни смесени монослоеове Lab/Sol показва, че скоростите на хидролиза са от един и същи порядък, т.е. наблюдава се адитивност в действието на ензима HLL. Оценен е съставът на смесения монослой Lab/Sol, образуван след междуфазовата дестабилизация на LNC. В случая на липолитичния ензим PLA₂, сравнението на стойностите на глобалните кинетични константи показва, че при монослоевите константата е с няколко порядъка по-висока от тази, получена при малки униламеларни везикули и при липидни нанокapsули. Следователно ензимният каталитичен акт, протичащ в липидната среда на монослоя, е много по-ефективен, отколкото на повърхността на везикулите и нанокapsулите.

1.2. Поведение и свойства на комерсиални белодробни сърфактантни препарати нанесени върху гранична повърхност вода/въздух (1)

Изследвани са дилатационните свойства, структурата и морфологията на филми от сложни липидно-белтъчни системи на много често използваните в клиничната практика белодробни сърфактантни препарати - Alveofact, Curosurf, Survanta и Exosurf (1). Въз основа на приложения реологичен модел са изчислени стойностите на дилатационната еластичност и специфичното време на релаксация, свързани с процесите на реорганизация, протичащи в монослоеве. Експериментално получените изотерми повърхностно налягане-площ и повърхностен потенциал-площ, реологичните свойства на адсорбционния слой и AFM изображения са сравнени с моделни липидни и белтъчни монослоеве. Получените количествени оценки и направените сравнения на четирите изследвани сърфактанта показват, че по-висока ефективност на разтичане имат Curosurf и Alveofact.

1.3. Самоорганизация на двуантенни и четириантенни олигоглицини в нано- и микро размерни тектомери. Свойства на тектомерите адсорбирани на фазовата граница вода/въздух (26, 28)

Двуантенните (T2) (26) и четириантенните (T4) (28) олигоглицини са синтетични съединения, които са биосъвместими и нетоксични. Двуантенните олигоглицини имат две олигоглицинови опашки с еднаква дължина (т.нар. антени), свързани с въглеродна верига, намираща се в средата между двете симетрични опашки. Четириантенните олигоглицини имат четири симетрични олигоглицинови опашки, свързани в края си към един въглероден атом. Във водни разтвори тези съединения имат склонност към самоорганизация, като се формират специфични надмолекулни нано- и микроструктури наречени тектомери.

Проучена е възможността за контролиране на свойствата на водните разтвори на два конкретни представителя тектомери от T2 и T4 чрез вариране на рН, състава на разтвора, температурата и различни инкубационни времена при приготвянето на разтворите им. С помощта на няколко взаимно допълващи се експериментални техники, включващи динамично разсейване на светлината, тензиометричен профилен анализ и микроинтерферометрични изследвания на тънки течни филми е разработен комбиниран протокол за охарактеризиране на получаваните тектомерни разтвори. Демонстрирана е възможността, чрез промени в температурата и композицията на T4 тектомерите да бъдат улавяни и отстранявани липополизахаридни замърсявания с ниски концентрации. Получените резултати добавят нови знания за природата на тези нови материали с оглед на възможните им приложения при разработването на лекарствени наноносители, за извличане на различни примеси от водни среди и др.

1.4. Свойства на други моделни системи – главен светлосъбиращ комплекс на фотосистема II (LHC II) (16) и полиамидоаминов (РАМАМ) дендример (29)

Основният светлосъбиращ комплекс на фотосистема II (LHCII) е важен регулаторен протеин във фотосинтетичните мембрани. В нативната тилакоидна мембрана LHCII

променя конформацията си и надмолекулната си макроорганизация при преминаване от състояние на събиране на светлина към фотозащита. Беше проведено моделно изследване на състоянието и структурите, образувани от ЛНСII, на фазовата граница вода/въздух в условия имитиращи съответно функционалните състояния на белтъка за събиране на светлина и за защита от светлина. Проведените експерименти демонстрираха недвусмислена разлика в надмолекулната структура на частично депротонирания и протонирания ЛНС II. Индуцираното рН-зависимо превключване в конфигурацията на ЛНСII дава по-плътна опакована, но гъвкава макроорганизация на комплексите.

Синтезиран беше нов синьо флуоресцентен полиамидамино дендример от второ поколение, модифициран по периферията с шестнадесет 4-N,N-диметиланиноетилокси-1,8-нафталамидни остатъци. Бяха изучени някои съществени обемни свойства на дендримера, като фотофизичните му характеристики в органични разтворители с различна полярност, влиянието на рН и на голям набор от различни катиони, върху интензивността на флуоресценцията му. Новосинтезираният дендример демонстрира антибактериална активност срещу грам-положителни бактерии *B. cereus* и грам-отрицателни бактерии *P. Aeruginosa*. След облъчване с видима светлина, антибактериалната активност съществено се усилва, поради генерирането на синглетни кислородни частици, които атакуват фазовата граница липид/вода и разрушават мембраните на бактериалните клетки.

II. Приноси свързани с моделни изследвания на кинетиката на адсорбция/десорбция на различни йони и повърхностно активни молекули върху фазови граници (21, 22, 24, 25, 27, 30, 31, 32).

Взаимодействието между йони и хидрофобни фазови граници вода/въздух и вода/масло привлича вниманието на биолози и химици от близо столетие. В това направление електролитната адсорбция остава най-информативната количествена характеристика на взаимодействието йон-фазова граница. Въпреки това няма установена процедура за количествена оценка на адсорбцията на електролитите. В литературата взаимодействията се дискутират по-скоро качествено, като се използва ефекта на електролита върху по-достъпни характеристики като повърхностното напрежение.

През 1887 г. Хофмайстер открива определена последователност в способността на различни йони да преципитират протеини: критичната концентрация на преципитация на протеин намалява в определен ред на йоните, който ред в наши дни е наречен лиотропен или Хофмайстеров ред. В следствие много свойства на такива хидрофобни повърхности показват йон-специфичност, често следвайки до определена степен оригиналния Хофмайстеров ред. Обикновено реда се променя с промяна на изследваната система. Дори за една и съща система, редът се променя в зависимост от свойството, което се проследява. И дори и за една и съща система и свойство, лиотропният ред се променя в зависимост от концентрацията на електролита. Оказва се, че разбирането на

йон-специфичните явления, които се проявяват върху хидрофобни повърхности, е трудно дори за най-простите системи. Йон-специфичността се контролира от много противоположни по посока, специфични взаимодействия йон-повърхност. Освен това измерваното повърхностно свойство често е йон-специфично в резултат на йон-специфичност в обема на разтвора. Следователно се нуждаем от по-добро разбиране на тези явления и тяхната класификация, тъй като лиотропните редове имат не само голямо биологично значение, но могат да влияят върху климата на Земята.

II.1. Експериментално определяне на адсорбцията на неорганични соли върху течни повърхности и повърхности, покрити с монослой от повърхностно активно вещество (21, 27, 31, 32)

Изследвано е поведението на йони в близост до чисти незаредени течни повърхности и повърхности с адсорбиран монослой с фокус върху умерено до силно концентрирани електролитни разтвори. Анализирани са йон-специфичните свойства на такива повърхности. Редовете на йон-специфичност (лиотропни, Хофмайстерови редове) са различни за повърхност вода/въздух, вода/масло, различни за повърхностното напрежение σ , повърхностния $\Delta\chi$ потенциал и се променят с концентрацията на разтвора.

Разработена е нова методика, която позволява да се установят различните фактори, които определят позицията на йона в Хофмайстеровия ред (21, 27, 32). Установено е, че директните взаимодействия йон-повърхност не са винаги най-важния фактор за наблюдаваните йонни последователности. Индиректните фактори, като например свойствата на конкретния електролитен разтвор са често много по-важни. Повърхностният $\Delta\chi$ потенциал в много случаи е нечувствителен към разпределението на йони в двойния електричен слой, но отразява ориентацията на водните молекули на повърхността през йон-специфичната диелектрична проницаемост ϵ на разтвора. Дори знакът на $\Delta\chi$ е често в резултат на намалението на ϵ в присъствието на електролит.

Разработена е методология за определяне на адсорбционната изотерма на електролити върху монослоеве при различни площи на молекула повърхностно активно вещество чрез комбинирано измерване на изотерми повърхностно налягане-площ и измерване на повърхностното налягане на равновесен разтечен монослой (21, 27, 32). Получените изотерми показват, че адсорбцията на йоните върху монослой има максимум при умерени солеви концентрации. Този максимум е обяснен през влиянието на три ефекта: свързването на йони към молекулите сърфактант, ефекта на изключения обем и осмотичен ефект. Методът е приложен за монослоеве от неразтворими алкохоли, разтечени върху повърхността на концентрирани разтвори на халиди (KCl, NaCl, NaBr, NaF). Измерената адсорбция на електролит е положителна и показва немонотонна зависимост от площта на молекула ПАВ. Разработеният метод е гъвкав и може да бъде приложен върху редица системи.

Изследвано е разпределението на два йона в близост до монослой додеканол чрез измерване на техния волта потенциал ΔV при няколко концентрации на натриев хлорид NaCl. Анализирано е кой от двата йона, Na^+ или Cl^- , застава по-близо до повърхността. Потенциометричните измервания предполагат, че натриевият йон Na^+ е специфично

адсорбиран, докато хлоридният йон Cl^- остава в дифузния слой. Силата, която предизвиква адсорбцията на Na^+ , най-вероятно е взаимодействието между йона и диполния момент на монослоя.

Равновесното налягане на разтичане (ESP) на повърхностно активно вещество представлява максималното понижение на повърхностното напрежение, което може да се постигне в равновесно състояние под температурата на Крафт (Krafft point). Експерименталните трудности при измерването на ESP са добре известни и не съществуват утвърдени, универсални протоколи за преодоляването им. Различните сърфактанти изискват индивидуален подход. Изследвани са три сърфактанта в твърдо агрегатно състояние, с различна склонност към разтичане на повърхност вода/въздух: частично разтворим n-додеканол (разтича се мигновено), перфлуороалкилираният аналог на додеканол (бавно разтичане) и дипалмитоилфосфатидил холин DPPC (неразтичащ се) (31). При n-додеканола силният латерален поток на Марангони, който се проявява при разтичането му, довежда до отместване на пластинката на Вилхелми и до кристали, които се закачат за нея. Добавянето на временна механична преграда, поставена пред разтичащите се кристали, смекчава този поток и позволява провеждането на по-точно измерване. Също така, предварителното насищане на водната фаза със сърфактанта предотвратява разтварянето на сърфактанта, намалява трикратно стандартната грешка и води до по-бързо установяване на равновесие. При перфлуороалкилирания аналог на додеканола усложненията идват от много бавната кинетика на достигане на равновесие. След поставянето на кристали сърфактант на повърхността, в рамките на един час повърхностното налягане достига плато преди установяването на равновесие „pre-equilibrium”, последвано от бавно достигане на равновесие в продължение на цяло денонощие. Показано е, че е по-добре да се определи равновесното разтичащо налягане чрез осредняване на стойностите от няколко измерени състояния на „pre-equilibrium”, отколкото да се изчака до достигането на пълно равновесие. При неразтворимия DPPC е установено, че съществува голям енергетичен бариер на масов пренос от кристал DPPC към водната повърхностна фаза. За да се преодолее енергетичния бариер, е необходимо да се приготви разтвор на DPPC в леснолетлив неразтворим във вода разтворител (напр. хлороформ) и този разтвор да се постави на повърхността в близост до кристалите DPPC, което улеснява процеса на разтичане до достигането на равновесното налягане (ESP).

II.2. Експериментално определяне на адсорбцията/десорбцията на слабо разтворими повърхностно активни вещества върху течни повърхности вода/въздух и вода/масло (22, 24, 25, 30)

Установено е, че десорбцията на монослоеве от деканол и додеканол в изобарни условия протича под смесен режим на бариерно-дифузен контрол. Скоростта на десорбция се определя като функция на компресията на монослоя, температурата, структурата на повърхностно активното вещество и концентрацията на електролита във водната подложка (22, 24). За течно-разтегнато състояние на монослоя, зависимостта на

характеристичното време за десорбция на молекула спрямо площта на молекула е линейна функция.

Разработен е нов метод за определяне на разтворимостта във вода на кристали от нейонни повърхностно активни вещества. Предложеният метод използва комбинирани данни от три независими експеримента: налягане на разтичане на кристали от повърхностно активни вещества, изотерма на повърхностното налягане спрямо площта на молекула и изобара на десорбция, при която се измерва изменението на площта на монослоя с времето, в изобарен режим. С помощта на описаната процедура, беше получена стойност за разтворимостта за кристали додеканол.

Експерименталните резултати показаха, че при достатъчно големи времена процесът на десорбция се ускорява. Наблюдаваното ускорение вероятно се дължи на появата на конвективна дифузия, но източникът на конвекция остава неидентифициран. Потенциалното изпарение на част от молекулите също би допринесло за наблюдаваното ускорение. И двата процеса могат само да ускорят, но не и да забавят скоростта на десорбцията в сравнение с чистия режим на дифузия. Бяха проверени няколко хипотези за причината за ускорена десорбция (25). Анализът показва, че естествената конвекция, конвекцията на Марангони, конвекцията, дължаща се на движението на механичната бариера на Лангмюровата вана, както и изкуствената конвекция, предизвикана от електромагнитна бъркалка, не могат да предизвикат достатъчно висока скорост на десорбция, каквато беше наблюдавана експериментално в предишни опити. Тези констатации за първи път убедително доказват, че конвективната дифузия има по-малка роля в процеса на пренос, отколкото се смяташе досега.

С помощта на тензиометър за профилен анализ, беше изследвана адсорбцията на фазовата граница вода/масло на хомоложна серия от трите най-късоверижни, водоразтворими флуоротеломерни алкохоли от типа $F(CF_2)_nCH_2OH$, с $n = 1, 2, 3$, адсорбиращи се на границата вода/хексан (30). За първи път беше определена енергията за пренос ($\Delta\mu_{CF_2}$) на един неполярен $-CF_2-$ остатък през граница от неполярната маслена фаза към полярната водна фаза. Измерването е направено за три различни температури, като е повишена точността на получените числени стойности за $\Delta\mu_{CF_2}$, спрямо наличните в момента литературни данни. Получените стойности за $\Delta\mu_{CF_2}$ са в рамките на очаквания порядък и са по-високи от съответната свободна енергия за пренос на $-CH_2-$ фрагмент от масло към вода. За провеждане на анализа на тензиометричните данни успешно бяха приложени адсорбционния модел на лепкавите дискове (sticky disk adsorption model) и молекулярно-термодинамичния модел за адсорбционната константа (K_a) на Иванов и съавтори. И двата модела са вече утвърдени и работят добре с по-дълговерижни маслено-разтворими хомоложни серии от сърфактанти. Установено беше, че повишаването на температурата води до повишаване на междуфазовото налягане, т.е. адсорбцията на изследваните перфлуороалкилирани алкохоли на границата вода/масло е ендотермичен процес.

$\Delta\mu_{CF_2}$ е фундаментална термодинамична характеристика, от съществено значение за съдбата на перфлуороалкилните вещества в околната среда и техните ефекти върху здравето, както и за моделиране на процесите на разделяне, които ги включват.

Получените резултати могат да бъдат много полезни при оценки на разпределянето на смеси от къси флуорирани амфифили между границата вода/масло и вода/биомембрани. Също така $\Delta\mu_{CF_2}$ е съществен параметър за прогнозиране на включването на флуорирани амфифили в мицели и в адсорбционни монослое от въглеродородни сърфактанти.

III. Приноси свързани с моделни изследвания на кинетиката на осмотични процеси в условията на постоянен или променлив обем (11, 12, 14, 15, 17, 19, 23).

Осмозата представлява спонтанно преминаване на разтворител през полупропусклива мембрана от фазата с по-висок химичен потенциал на разтворителя към фазата с по-нисък химичен потенциал. Преносът продължава, докато химичните потенциали се изравнят от двете страни на мембраната. Разликата в концентрацията на двата разтвора предизвиква пренос на разтворител и създава разлика в налягането през мембраната (осмотично налягане Π). Този транспорт на разтворител през мембраната по същество е хидродинамичен процес. В литературата преобладават теоретичните или експерименталните изследвания на осмозата след достигане на равновесие, докато кинетичните аспекти на процеса, които представляват реален интерес за естествените (биологични) структури, като например живите клетки и много технологични приложения, са сравнително по-малко изследвани. В класическата мембранна осмометрия, осмотичното налягане се определя директно от стойността на хидростатичното налягане, установено в „отворен режим“ – чрез повишаване на нивото на течността в отделението за разтвор.

Приложихме нов експериментален подход и модификация на класическата експериментална постановка за измерване на осмотично налягане. С помощта на специално конструиран за целта мембранен осмометър, направихме кинетично изследване на осмотичния процес, в условия на постоянен или слабо изменящ се обем. Получени са количествени данни за зависимостта на скоростта на осмотичното действие на разтворителя от относителното изменение на обема на разтвора. Експериментално беше наблюдаван и установен нов, нетривиален ефект – максимум в скоростите на пренос на разтворител през мембраната. Опитът ни за теоретична интерпретация на кинетичните максимуми доведе до концепцията за т. нар. поляризационен ефект в пространството близо до мембраната: локално разреждане на разтвора, дължащо се на притока на разтворител, което от своя страна повишава дифузионния поток от обема.

17.09.2024 г.

Подпис:

София

гл. ас. д-р Иван Любомиров Минков