



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**Институт по микробиология „Стефан Ангелов”**  
*Департамент “БИОТЕХНОЛОГИЯ”*  
*Лаборатория “БИОРЕМЕДИАЦИЯ И БИОГОРИВА”*

Мариета Димитрова Белчева

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна  
степен „Доктор“

Професионално направление **4.3 „Биологически науки“**

Научна специалност **01.06.12 „Микробиология“**

на тема:

**“Нови фотосенсибилизатори и въглеродни компози-  
зити, като агенти с антимикробно действие”**

Научни ръководители:

Проф. д-р Людмила Кабаиванова

Проф. д-р Бойко Цинцарски

Научно жури:

Проф. Пенка Петрова, дн

Проф. д-р Милка Милева

Проф. Стефан Панайотов, дн

Доц. д-р Михаил Петров, дм

Доц. д-р Георги Чернев

Дисертационният труд обхваща 148 страници, съдържа 56 фигури и 4 таблици. Библиографската справка включва 304 литературни източника. Номерацията на фигурите в автореферата не съответства на номерацията в пълния текст на дисертацията.

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в микробиологичните лаборатории на Факултета по дентална медицина, Медицински университет-София, България; Катедра микробиология при Университетски медицински център Грьонинген, Холандия; Диагностично-консултативен център Софиямед, България; Институт по клинична микробиология Университетска клиника Мюнстер, Германия и Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“ в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“-БАН, България.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ на 16.07.2024 г. в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на .....2024 г. от ..... в заседателната зала на Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

## Списък на съкращенията:

AC	активен въглен
ACCAg	метал-въглеродни композити, съдържащи сребро
ACCCu	метал-въглеродни композити, съдържащи мед
ACCMg	метал-въглеродни композити, съдържащи магнезий
ATCC	Американска колекция на типови култури
EDTA	етилендиаминтетраоцетна киселина
LED	светодиод
MRSA	метицилин резистентен <i>S. aureus</i>
NBIMCC	Националната банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури на България
Pc	фталоцианинови комплекси
ROS	реактивни кислородни съединения
XRD	рентгенова прахова дифракция
XPS	рентгенова фото-електронна спектроскопия
АТФ	аденозинтрифосфат
БЕТ	Брунауер – Емет – Телер
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
СЕМ	сканираща електронна микроскопия
ФДТ	фотодинамична терапия

## 1. Увод

Антимикробната резистентност представлява световен здравен проблем, който кара Световната здравна организация да я обяви за една от 10-те най-големи глобални заплахи за здравето. Научните изследвания върху разработване на нови терапевтични средства, методи и техники с механизъм на действие, различен от този на широко прилаганите антибиотици и химиотерапевтици, придобиват все по-голямо значение, поради темповете на нарастване на лекарствената резистентност.

Бактериите в много случаи са причинителите на заболявания, които се разпростират в областта на устата, зъбите и челюстта от кариозни лезии, през заболявания на пародонта, до бактериални инфекции на меките тъкани.

През последните години, наличните методи на обработка с цел бактериална редукция в пародонтологията и кариологията са много ефикасни и могат да се разглеждат като златен стандарт. За да оптимизираме още повече борбата с бактериални инфекции в устната кухина и тяхната профилактиката и да получим по-добра бактериална редукция и същевременно да минимизираме негативните последствия на използваните днес методи, в тази работа се проучва ефектът на фотодинамичното инактивиране на нови метало-съдържащи фталоцианинови фотосенсибилизатори срещу едни от най-често срещаните микроорганизми *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*.

Освен това, в наши дни нараства интересът към други съединения с антибактериален потенциал, а именно металните наночастици и техните оксиди. Активният въглен намира широко приложение в пречистването на води и въздух. Метал-съдържащите въглеродни композити обединяват свойствата на металите и на активния въглен и по този начин допринасят за разширяване областите на приложението му, основавайки се на техните антибактериални свойства. Възможно приложение е изработването на така актуалните (както в условията на пандемията от ковид-19) и масово използвани и в момента защитни маски и пречистватели на въздух, които са винаги необходими в операционните зали и здравните заведения като цяло. Така, друг аспект на настоящата работа е да се проучи ефектът на инактивиране на клинично значими микроорганизми от нови метал-въглеродни композити.

## 2. Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е изпитване на антимикуробното действие на новосинтезирани, съдържащи метали фталоцианинови фотосенсибилизатори и въглеродни композити, с оглед приложението им съответно като алтернатива в борбата с инфекции в лицево-челюстната област и като антибактериални агенти при пречистване на въздух.

Във връзка с така поставената цел се набелязаха следните задачи:

2.1. Оценка на антимикуробното действие на новосинтезирани метал-съдържащи фталоцианинови фотосенсибилизатори:

1. Подбор на орални патогени, върху които да бъде оценявано въздействието на ФДТ.
2. Определяне на фотодинамичното инактивиране върху суспензии от референтни микроорганизми.
3. Определяне на фотодинамичното инактивиране върху суспензии от клинични изолати.
4. Изпитване на фотодинамичното инактивиране върху биофилми от микроорганизми.

2.2. Оценка на антимикуробното действие на новосинтезирани метал-въглеродни композити:

1. Физико-химично охарактеризиране на метал-въглеродните композити.
2. Подбор на патогени, върху които да бъде оценявано въздействието на метал-въглеродните композити.
3. Анализ на влиянието на вида на метала в метал-въглеродните композити върху суспензии от Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми.
4. Анализ на влиянието на концентрацията на метала в метал-въглеродните композити върху суспензии от референтни микроорганизми.

### 3. Материали и методи

В настоящото проучване беше изпитано фотодинамичното инактивиране на:

-*Staphylococcus aureus* 1337, (MRSA) *Enterococcus faecalis* 391574 NBIMCC, *Candida albicans* 74 NBIMCC *S. aureus* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори: хематопорфирин, метиленово синьо, цинк- и галий-съдържащи фталоцианини при три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. С LED лампа с дължина на вълната 637 nm;

-клинични изолати на *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, с цинк- и галий-съдържащи фталоцианини при два интервала на облъчване: 5 и 12 мин;

-*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 3247, *Prevotella intermedia* ATCC 49046 и съответните клинични изолати с тетра-метилпиридилокси Zn Pc; p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc;

-MRSA 48-часов биофилми с алуминий-съдържащи фталоцианини при интервал на облъчване 5 мин;

-*Enterococcus faecalis* 24-часов и 48-часов биофилм със силициев фталоцианин и 48-часов биофилм с галиев фталоцианин като фотосенсибилизатор при интервал на облъчване 5 мин.

Активните въглени са синтезирани чрез едноетапен хидропиролиз, твърдофазен синтез и физическа активация с CO<sub>2</sub>. За синтеза на метал-въглеродни композити са използвани следните метали в количество 10 масови %: магнезий (ACCMg), сребро (ACCAg) и мед (ACCCu). Те са добавени по време на получаване на активния въглен в процеса на твърдофазния синтез и след получаване на активния въглен, чрез импрегниране при хидропиролиза и химическата активация. Получените по трите метода метал-въглеродни композити са тествани за антибактериален ефект срещу *Escherichia coli* K-12 ATCC 25922.

Метал-въглеродните композити, получени чрез хидропиролиз ACCCu с различни масови % на медта (2.5, 5, 7.5 и 10%) също са тествани за антибактериален ефект срещу *Escherichia coli* K-12 ATCC 25922.

Метал-въглеродни композити, получени чрез хидропиролиз (ACCMg, ACCAg, ACCCu) са изследвани за антибактериален ефект и срещу клиничен изолат *S. aureus*.

Физико-химичните свойства на метал-въглеродни композити, получени чрез хидропиролиз (ACCMg, ACCAg, ACCCu) са анализирани чрез сканираща електронна микроскопия (SEM), елементен анализ, БЕТ анализ, рентгено-структурен анализ (XRD), рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS).

Определянето на преживелите микроорганизми при изброените по горе експерименти е чрез стандартните техники за определяне на микробното число.

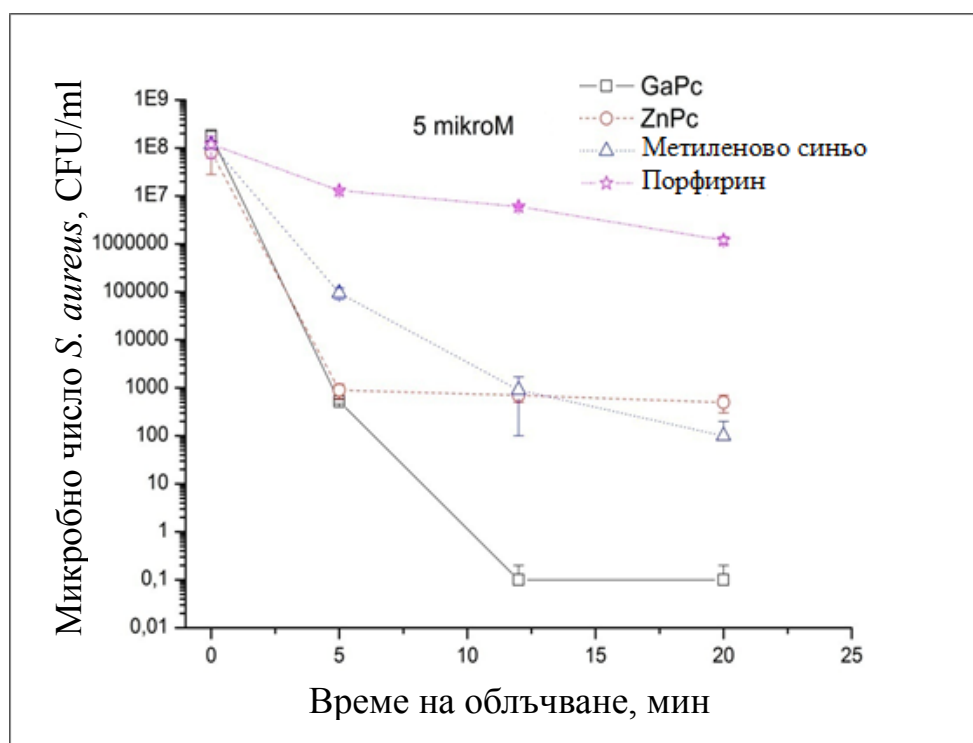
## 4. Резултати и обсъждане

### 4.1. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтни щамове

#### 4.1.1. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *S. aureus* 1337

В настоящото проучване беше изпитана бактериална суспензия *S. aureus* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори: хематопорфирин, метиленово синьо, цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин.

На фиг. 1 са представени обобщените резултати от опитите спрямо интервалите в минути и е отчетено микробното число в CFU/ml.



**Фиг. 1** Фотодинамична инактивация на *S. aureus* 1337 с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc), хематопорфирин, метиленово синьо.

Най-голяма микробна редукция беше постигната при галиевите фталоцианини, като експозиция 12 и 20 мин. доведе до пълно унищожение на бактериите, докато най-слаби резултати се наблюдават при хематопорфирина.

Според проведено проучване, целящо да се определи ефекта на фотодинамичната терапия върху 20 вида от род *Staphylococcus*, използвайки метиленово синьо и нискоенергиен лазер, редукцията на бактериите е в границите от 4.89 до 6.83 (log<sub>10</sub>) CFU/ml (Miyabe et al., 2011). Настоящата работа потвърждава тези резултати и предлага по-ефективно средство за инактивиране на *S. aureus*, каквото се явява галий-фталоцианина.

В друго проучване, суспензията от *S. aureus* е изложена на LED с дължина на вълната 628 nm, 14.6 mW/cm<sup>2</sup> и енергийна плътност от 20 J/cm<sup>2</sup>, 40 J/cm<sup>2</sup>, и 60 J/cm<sup>2</sup> в присъствието на различни концентрации порфирин (Photogem). Работено е с три концентрации 12 µl/ml, 25 µl/ml и 50 µl/ml. Резултатите показват, че излагането на 60 J/cm<sup>2</sup> елиминира 100% от бактериите. Най-добри резултати в елиминирането на *S. aureus* са постигнати при облъчване с LED в комбинация с фотосенсибилизатор с концентрации от 25 µl/ml до 50 µl/ml (Gois et al., 2010). В настоящата работа се получават слаби резултати при използване на порфирин, вероятно поради по-ниските концентрации на веществото и по-ниската енергийна плътност.

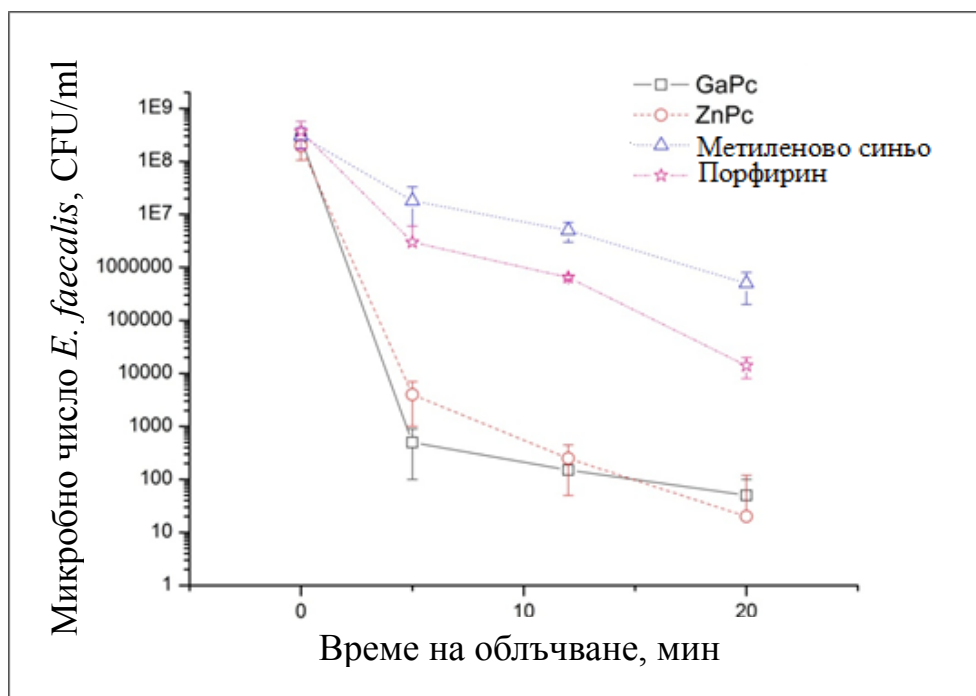
#### **4.1.2. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *E. faecalis* NBIMCC 391574**

При проведеното научно изследване бяха тествани бактериална суспензия *E. faecalis* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори: хематопорфирин, метиленово синьо, цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин.

Наблюденията ни показаха, че микробното число на бактериална суспензия *E. faecalis*, когато е третирана с хематопорфирин при 5 мин., намалява с 2 log, при 12 мин. с 3 log<sub>10</sub>, а при 20 мин. облъчване с 4,5 log<sub>10</sub>. Когато е третирана с метиленово синьо при 5 мин. и 12 мин. облъчване, намалява с 2 log<sub>10</sub>, а при 20 мин. с 3 log<sub>10</sub>. При третиране с цинк-съдържащи фталоцианини при всички интервали на облъчване, намалението е с 5 log<sub>10</sub> при 5 мин., с 6 log<sub>10</sub> при 12 мин. и със 7 log<sub>10</sub> при 20 мин. Когато третираме с галий-съдържащи фталоцианини, отчитаме понижение с 6 до 6,5 log<sub>10</sub> с увеличаване интервала на облъчване от 5 до 20 мин.



На фиг. 2 са представени обобщено резултатите от опитите. Отчетено е микробното число в CFU/ml по отношение на интервалите в минути. Най-слаби резултати се наблюдават при метиленовото синьо и хематопорфирина, а най-голяма микробна редукция беше постигната при галий - и цинк - фталоцианините. Експозиция от 20 мин. доведе до пълно унищожение на бактериите.



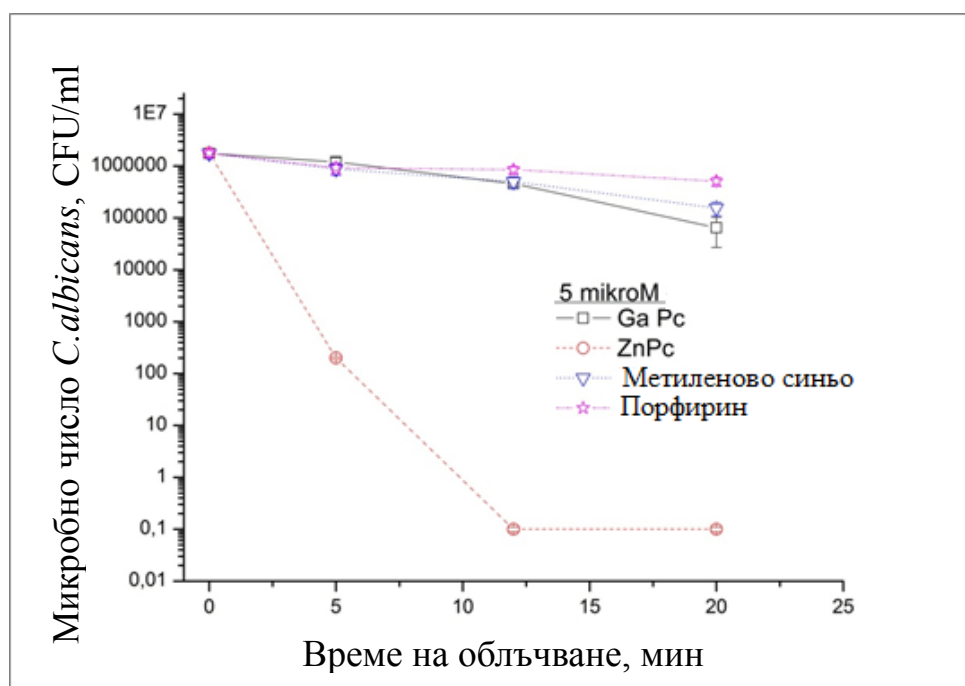
**Фиг. 2** Фотодинамична инактивация на *E. faecalis* NBIMCC 3915 с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc), хематопорфирин, метиленово синьо.

Графиките, отразяващи намалението на микробното число в зависимост от времето на облъчване и фотосенсибилизаторите и при този обект на въздействие започват от обща точка, която отразява трите контроли за четирите фотосенсибилизатори, поради липсата на статистически значима разлика в стойностите на микробното число. За всички контроли микробното число е около  $10^8$  CFU/ml и се вижда ясно как то намалява при комбинираното въздействие на светлината с багрилото. Зависимостта не е правопрпорционална и при четирите багрила е съвсем леко изразена, т.е. увеличението на дъжината на интервала на облъчване не води до съществено усилване на ефекта на фотосенсибилизатора.

### 4.1.3. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *C. albicans* NBIMCC 74

Експериментите продължиха с третиране на дрождева суспензия *C. albicans* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори: хематопорфирин, метиленово синьо, цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин, осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. Резултатите показаха, че не се отчита ефект върху микробното число на суспензията от *C. albicans* 0.5 MF, когато е третирана с хематопорфирин. Третирането с метиленово синьо и галий-съдържащи фталоцианини показва намаление на дрождите 10 пъти едва при 20 мин. експозиция, докато при третиране с цинк-съдържащи фталоцианини с 4 log10, при 5 мин. облъчване, а при 12 мин. и 20 мин. с 6 log10.

На фиг. 3 са представени резултатите от опитите. На абсцисата са нанесени интервалите в минути, на ординатата-микробното число в CFU/ml.



**Фиг. 3** Фотодинамична инактивация на *C. albicans* с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc), хематопорфирин, метиленово синьо.

Най-слаби резултати се наблюдават при хематопорфирина. Съвсем лека редукция в рамките на един log10 има при метиленовото синьо и галий, а

най-голяма микробна редукция е постигната при цинк-фталоцианините, като експозиция 12 мин. доведе до пълно унищожение на бактериите.

Според проучване за LED-медираната фотодинамична терапия върху планктонни култури от *C. albicans*, третирани с еритрозин в концентрации от 0.39–200  $\mu\text{M}$  и биофилми, формирани от *C. albicans* с 400  $\mu\text{M}$  еритрозин, ефектът от ФДТ при планктонните култури е 100% унищожаване-при концентрации, по-големи или равни на 3.12  $\mu\text{M}$ , а при биофилмите се отчита редукция с 0.74  $\log_{10}$  CFU/ml (Costa et al., 2011).

Цел на други експерименти е повлияването на букалната кандидоза при експериментални животни. Плъховете, третирани с лазер и фотосенсибилизатор метиленово синьо показват по-ниски нива на епителна алтерация и по-слаба изява на хронично възпаление, отколкото контролните групи (Junqueira et al., 2009). При опити с имunosупресирани мишки се установява цялостно ерадикиране на *C. albicans* от устната кухина при употребата на 450 – 500  $\mu\text{g/ml}$  метиленово синьо и 664 nm дължина на вълната на диодния лазер (Teichert et al., 2002). Добрите резултати вероятно се дължат на много голямата концентрация на метиленово синьо в сравнение с използваната в настоящата работа, при която е достигнато само десетократна редукция на микробното число. Друго изследване показва дозозависим спад на *C. albicans* при лечение на мукокутанната и кутанна кандидоза с ФДТ с фотофрин (photofrin). В този експеримент се установява, че метаболитната активност на биофилма от *C. albicans* след обработка с ФДТ е по-ниска в сравнение с тази при третиране с амфотерацин В. Двете въздействия са проведени едновременно (Chabrier-Roselló et al., 2005).

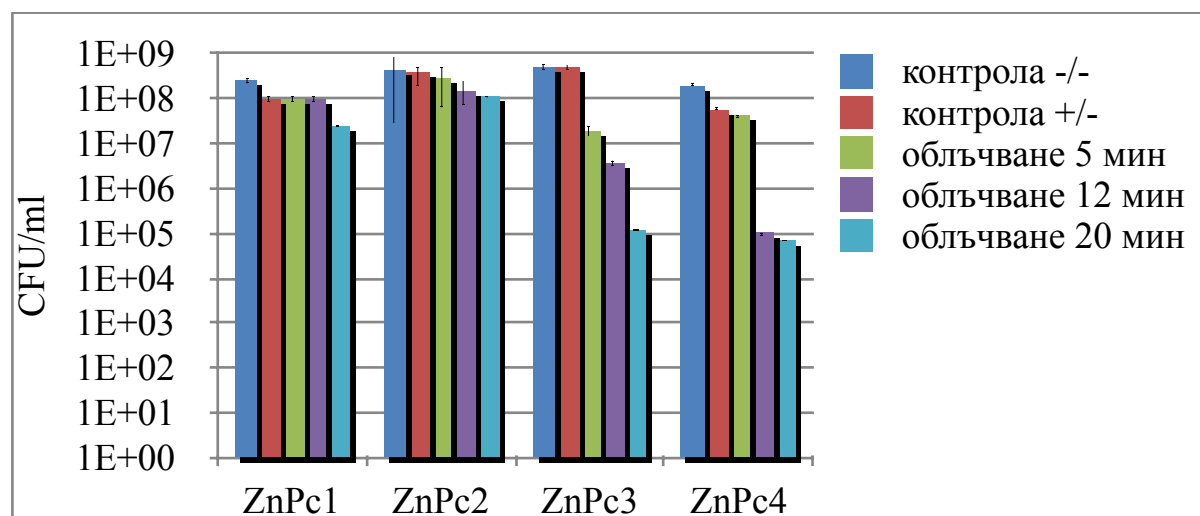
Отново, както и при предходните експерименти няма статистически значими разлики в стойностите на микробното число на контролите и по тази причина, графиките започват от обща точка, която отразява трите контроли за четирите фотосенсибилизатори. За всички контроли микробното число е около  $10^6$  CFU/ml и се вижда ясно как то намалява при комбинираното въздействие на светлината с багрилото. Зависимостта не е правопрпорционална и при четирите багрила е съвсем леко изразена, т.е. увеличението на дължината на интервала на облъчване не води до съществено усилване на ефекта на фотосенсибилизатора, с изключение при цинк-съдържащите фталоцианини, където графиката е стръмна до 12-тата минута, когато се достига пълно унищожаване на дрождите. Като цяло може да се обобщи, че дрождите като по-висши организми се повлияват по-трудно от ФДТ.

#### **4.1.4. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523**

В хода на експерименталната работа беше включена и бактериална суспензия от *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини, с концентрация 5  $\mu\text{M}$ : (1) тетра-метилпиридилокси Zn Pc; p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли: светлинна контрола (-/+)- без фотосенсибилизатор, но осветена; тъмнинна контрола (+/-) - с фотосенсибилизатор, но без светлина (за тъмнинна токсичност); бактериална контрола (-/-) - само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор и без светлина). При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведоха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и работеща при 32 mW.cm<sup>-2</sup>. Определянето на микробното число беше използвано като метод за оценка на ефекта.

На фиг. 4 са представени обобщено резултатите от опитите като стълбцова диаграма.

На абсцисата са нанесени четирите използвани фотосенсибилизатори,



**Фиг. 4** Фотодинамична инактивация на *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 с ZnPc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc3 (n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопиридин Zn Pc).

като за всеки има по 5 стойности на микробното число-съответно по 5 стълба. Първият отразява бактериалната контрола -/-, вторият тъмнинната контрола +/-, третият показва опита с облъчване 5 мин., четвъртият описва облъчване от 12 мин., петият отразява опита с облъчване 20 мин. Светлинната контрола не е показана, поради статистически незначимите

разлики в стойностите на микробното число на контролите. На ординатата е нанесено микробното число в CFU/ml.

От диаграмата е видно, че при първото и второто съединение почти няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, независимо от времето на експозиция. При третото съединение няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, при 5 и 12 мин време на експозиция, но при 20 мин е постигната редукция с 4 log<sub>10</sub>. При четвъртото съединение няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, при 5 мин време на експозиция, но при 12 и 20 мин е постигната редукция с 3 log<sub>10</sub>. Най-силно въздействие върху *A. actinomycetemcomitans* има окта-меркаптопиридин Zn Pc. Този резултат е по-добър от редукцията, постигната при прилагане на фотосан, с време на инкубиране заедно с бактериалната суспензия от 15 мин и време на облъчване 30 и 60 мин, която е съответно един и два log<sub>10</sub> (Nerl, 2010).

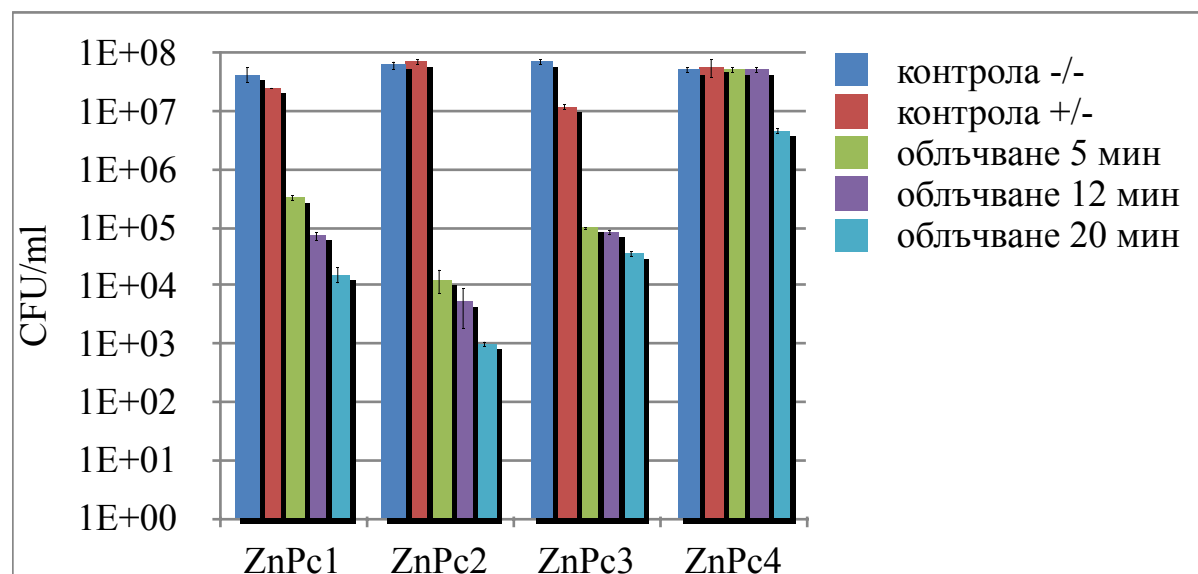
Като цяло, при Грам отрицателните бактерии поради сложния строеж на клетъчната стена, проникването на фотосенсибилизаторите е затруднено, особено за тези с големи молекули. Затова някои автори предлагат използване на мембранно-увреждащи средства, такива като 10% EDTA към фотосана за постигане на по-добри резултати (Maisch et al., 2009). Въпреки това има данни, че фталоцианините, порфирините и фенотиазините имат ефект и при положителните и при отрицателните по Грам бактерии, дори и без подобни средства.

#### **4.1.5. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *P. gingivalis* ATCC 3247**

Бактериална суспензия *P. gingivalis* ATCC 3247 0.5 MF също беше включена в научното изследване и беше тествана с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини с концентрация 5 μM: тетра-метилпиридилокси Zn Pc; p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли: светлинна контрола (-/+ ) - без фотосенсибилизатор, но осветена; тъмнинна контрола (+/-) - с фотосенсибилизатор, но без светлина (за тъмнинна токсичност); бактериална контрола (-/-) - само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор, без светлина). При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и работеща при 32 mW.cm<sup>-2</sup>. Определянето на микробното число беше използвано като метод за оценка на ефекта.

На фиг. 5 са представени обобщено резултатите от опитите като

стълбцова диаграма, аналогично на предходната точка.



**Фиг. 5** Фотодинамична инактивация на *P. gingivalis* ATCC 3247 с Zn-Pc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc3 (n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопиридин Zn Pc).

От диаграмата е видно, че при първото съединение има правопрпорционална зависимост от времето на експозиция, като при 5 мин. е постигната редукция с 2 log<sub>10</sub>, при 12 мин е постигната редукция с 3 log<sub>10</sub>, при 20 мин е постигната редукция с 4 log<sub>10</sub>. При второто съединение при 5 и 12 мин редукцията е с 4 log<sub>10</sub>, а при 20 мин е с 5 log<sub>10</sub>. При третото съединение - при 5 мин е постигната редукция с около 2.5 log<sub>10</sub> при трите времена на експозиция. При четвъртото съединение няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, при 5 и 12 мин време на експозиция, но при и 20 мин експозиция, се стига до редукция с 1 log<sub>10</sub>. Най-силно въздействие върху *P. gingivalis* ATCC 3247 има p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc, но и при тетра-метилпиридилокси Zn Pc се достига редукция с 3 log<sub>10</sub>. Окта-меркаптопиридин Zn Pc не показва добър ефект.

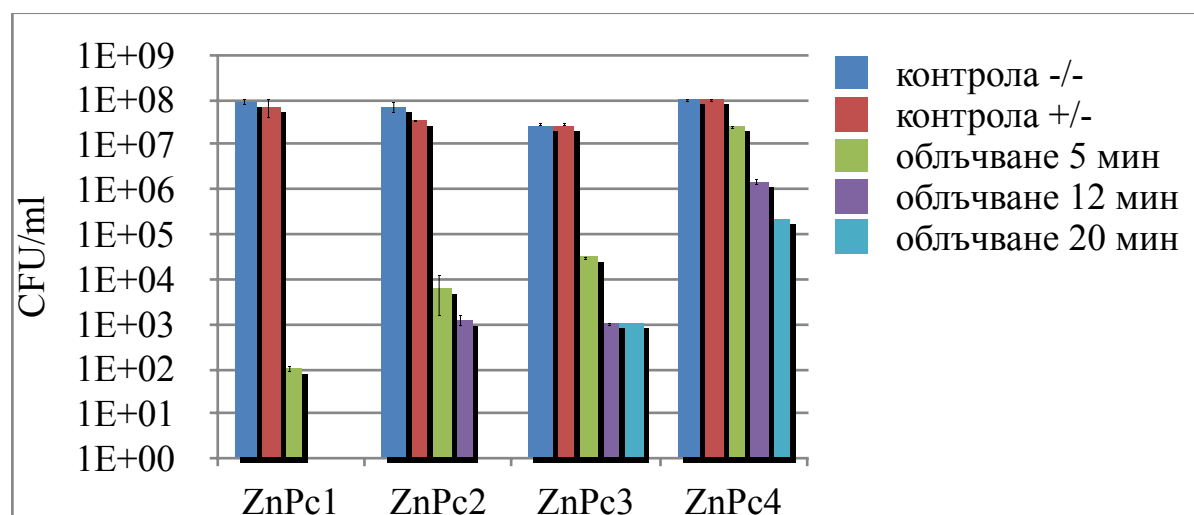
При подобно проучване (Rai et al., 2016), но с метиленово синьо 10 μM е постигната редукция с 3.5 log<sub>10</sub>, при облъчване 20 s с лазерна светлина с 665 nm, като не се забелязва правопрпорционална зависимост от дозата на светлината. При *in vivo* проучване, изследващо елиминирането на *P. gingivalis* също с помощта на толуидиново синьо, се установява, че фотодинамичното инактивиране не зависи от дозата на светлината при използване на 630 nm диоден лазер, а зависи от концентрацията на фотосенсибилизатора при по-ниски светлинни дози. Смята се, че този

ефект се дължи на достатъчни дози енергия, подадени на пробата, за да се активират всички налични фотосенсибилизатори, като по този начин се генерират достатъчно кислородни радикали, за да се убият бактериите (Kömerik et al 2003). Установено е също, че освен унищожаването на клетките на *P. gingivalis* чрез фотодинамична инактивация, факторите на вирулентност на този патоген също се инактивират от процеса, като по този начин се осигурява друго предимство на тази терапия пред конвенционалните лечения (Kömerik et al 2000).

#### 4.1.6. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от референтен щам *P. intermedia* ATCC 49046

Последва експеримент с бактериална суспензия от *P. intermedia* ATCC 49046 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини с концентрация 5  $\mu\text{M}$ : тетра-метилпиридилокси Zn Pc; р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; п-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли, както при предходния. Времето за инкубация при използваните фотосенсибилизатори беше 5 мин. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и работеща при 32  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

На фиг. 6 са представени обобщено резултатите от опитите като стълбцова диаграма. Показан е броя преживели бактерии, в зависимост от вида на фотосенсибилизатора и продължителността на експозицията.



**Фиг. 6** Фотодинамична инактивация на *P. intermedia* ATCC 49046 с ZnPc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc3 (п-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопиридин Zn Pc).

Диаграмата показва, че при първото съединение при 5 мин. се реализира редукция с 6 log10. При 12 и 20 мин. е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При второто съединение при 5 мин и 12 мин. се стига до редукция съответно с 4 log10 и 5 log10, а при 20 мин. е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При третото съединение при 5 мин е постигната редукция с около 3 log10, а при 12 и 20 мин редукция е около 5 log10. При четвъртото съединение има правопрпорционална зависимост от времето на експозиция, като при 5 мин се достига четирикратно намаляване на бактериите и при следващите времена на експозиция 12 мин и 20 мин е постигната редукция с по 1 log10. Най-силно въздействие върху *P. intermedia* ATCC 49046 има тетраметилпиридилокси Zn Pc, но и при р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc и п-тетра-меркаптопиридин Zn Pc е постигната редукция с най-малко 3 log10, докато окта-меркаптопиридин Zn Pc няма добър ефект. При подобно проучване (Rai et al., 2016), но с метиленово синьо е постигната редукция с 3log10, при облъчване 20 s с лазерна светлина с 665 nm. Като също се забелязва правопрпорционална зависимост от дозата на светлината.

*P. gingivalis* и *P. intermedia* са черни пигментирани анаероби, за които е установено, че натрупват ендогенни порфирини, димерен протопорфирин IX и мономерен протопорфирин IX. Тези ендогенни порфирини имат силен пик на абсорбция при приблизително 400 nm, което съответства на синята светлина. Поради тази причина редица проучвания показват, че при облъчване със синя светлина и двата патогена могат да бъдат фотоинактивирани в отсъствие на екзогенен фотосенсибилизатор (Soukos et al., 2005; Hope et al., 2013, 2016; AbdulAzeez et al., 2014). Излагането само на 665 nm лазерна светлина, също води до значително намаляване на броя на жизнеспособните *P. gingivalis* и *P. intermedia*, макар и в по-малка величина в сравнение с групата, третирана и с фотосенсибилизатор (Rai et al., 2016). Такъв ефект не беше забелязан в настоящата работа.

## **4.2. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клинични щамове**

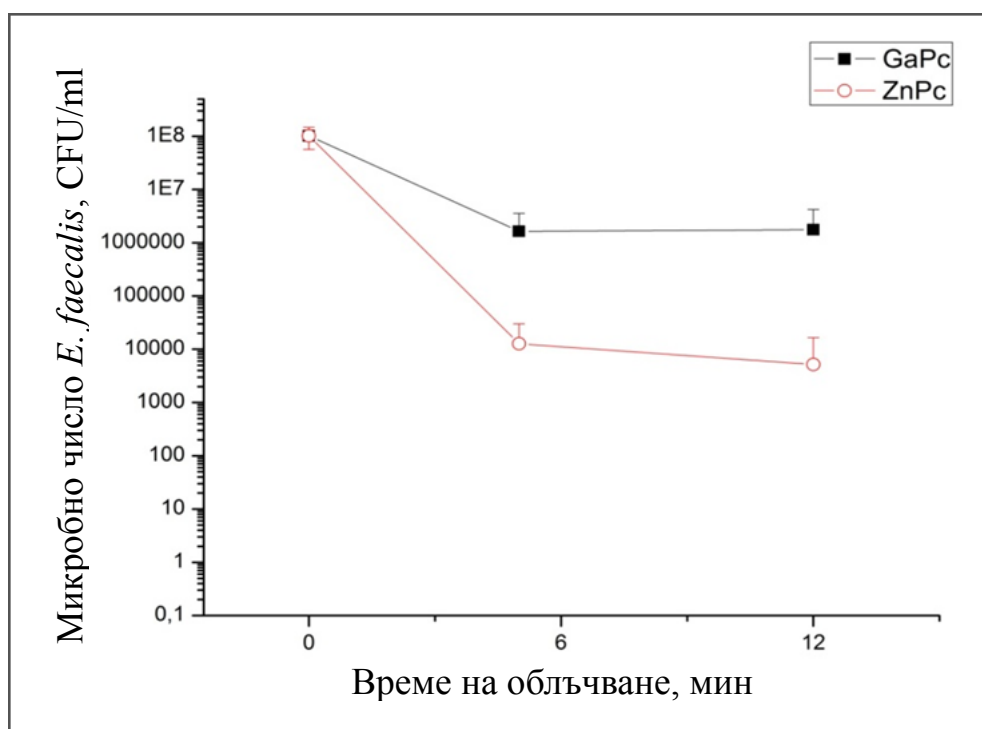
### **4.2.1. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *E. faecalis***

Използвана е бактериална суспензия на клиничен изолат *E. faecalis* 0.5 MF с два фотосенсибилизатора: цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с два интервала на облъчване: 5 и 12 мин. Отчетените резултати показаха, че микробното



число на суспензията *E. faecalis*, когато е третирана с галий-съдържащи фталоцианини, намалява 100 пъти при 5 и 12 мин., а когато е третирана с цинк-съдържащи фталоцианини, намалението е с 4 log<sub>10</sub> при 5 мин облъчване, а при 12 мин. намалява с 4,5 log<sub>10</sub>.

На фиг. 7 са представени обобщено резултатите от опитите. Показана е зависимостта на бактериалната редукция от вида на фотосенсибилизатора и продължителността на облъчването. Най-голяма микробна редукция беше постигната при цинк-фталоцианините, като нито една от изпробваните комбинации багрило/интервал на експозиция не доведе до пълно унищожение на бактериите.



**Фиг. 7** Фотодинамична инактивация с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc) на клиничен изолат *E. faecalis* от пациент с хроничен периодонтит.

За всички контроли микробното число е около 10<sup>8</sup> CFU/ml и се вижда ясно как то намалява при комбинираното въздействие на светлината с багрилото. Не се наблюдава увеличение на ефекта с увеличение на интервала на облъчване и при двата фотосенсибилизатора, което предполага по-нататъшни проучвания с по-краткия интервал.

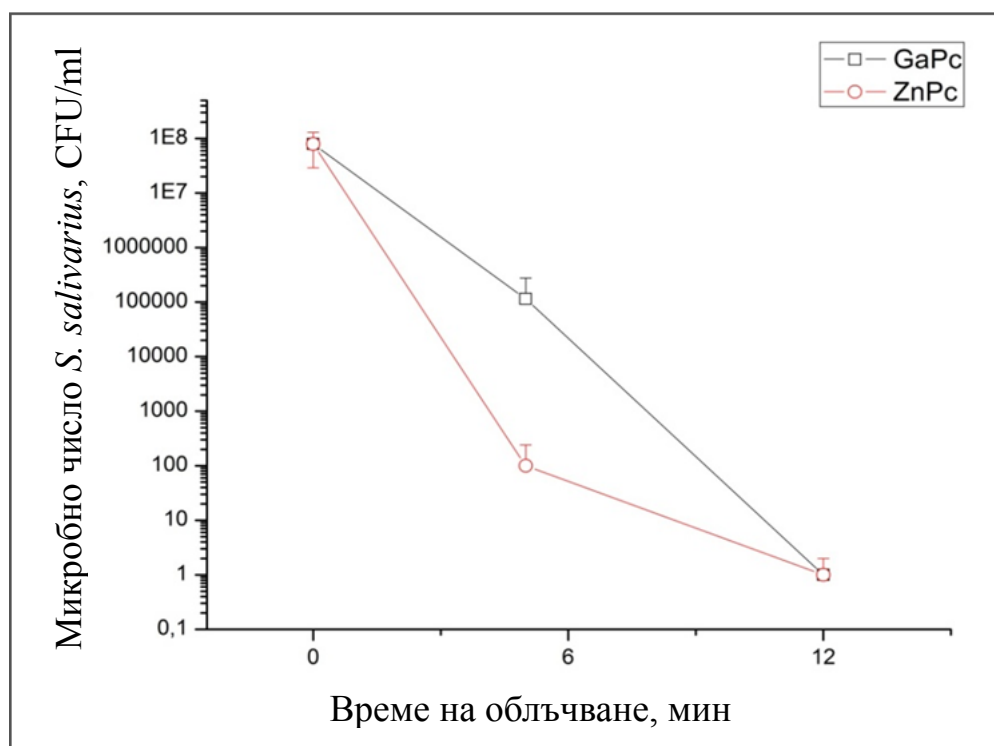
В сравнение с референтния щам, клиничният изолат по-трудно се повлиява от ФДТ.

#### 4.2.2. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *S. salivarius*

При научния експеримент бяха тествани бактериална суспензия клиничен изолат *S. salivarius* 0.5 MF с два фотосенсибилизатора: цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с два интервала на облъчване: 5 и 12 мин. Бяха наблюдавани следните резултати: микробното число на суспензията *S. salivarius*, когато е третирана с галий-съдържащи фталоцианини намалява с 3 log10 при 5 и със 7 log10 при 12 мин.; когато е третирана с цинк-съдържащи фталоцианини намалява с 6 log10, при 5 мин. облъчване, а при 12 мин. – редукцията е със 7 log10.

Най-голяма микробна редукция беше постигната при интервал на облъчване 12 мин., като двата фотосенсибилизатора имаха еднакъв ефект. При 5-минутния интервал, по-добър ефект имаше цинковият фталоцианин.

На фиг. 8 са представени обобщено резултатите от проведените експерименти. На абсцисата са нанесени интервалите в минути, на ординатата- микробното число в CFU/ml.



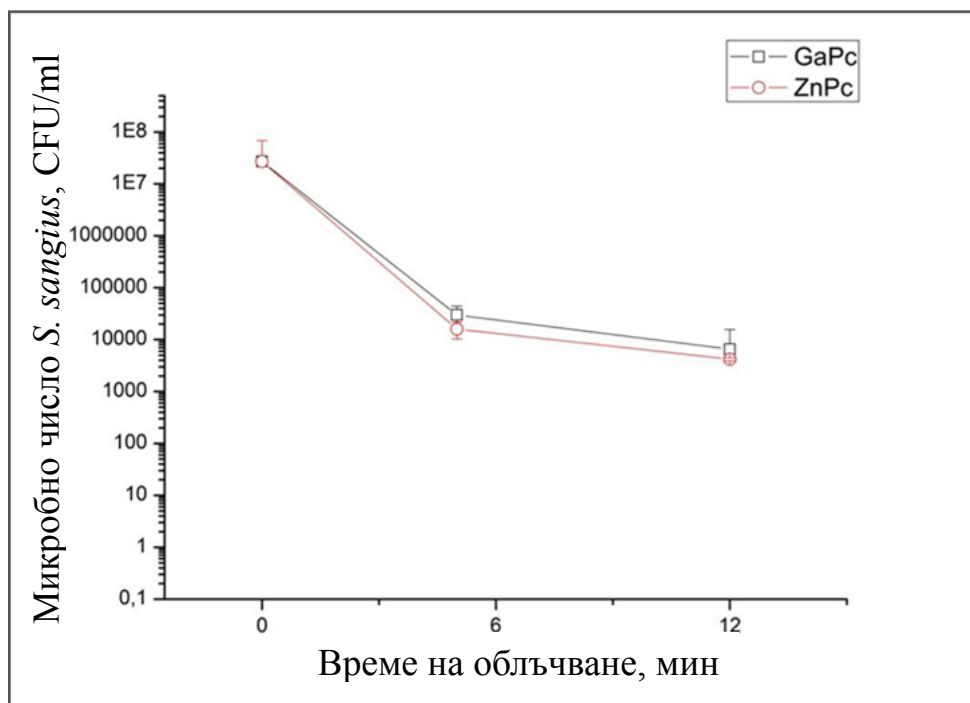
**Фиг. 8** Фотодинамична инактивация с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc) на клиничен изолат *S. salivarius* от пациент с хроничен периодонтит.

На изолирания клиничен щам беше направена антибиограма, която показва следната чувствителност: Clindamycin (R), Erythromycin (R), Minocycline (R), Chloramphenicol (I), Levofloxacin (S). Това означава, че при този пациент най-подходящи за лечение са хинолоните, докато макролидите, хлорамфениколът и клиндамицинът не биха имали ефект. Следователно, това е добър пример, когато поради резистентност на изолата и чувствителност към по-високо токсични медикаменти може да се предпочете провеждането на ФДТ.

#### 4.2.3. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *S. sanguis II*

При извършеното проучване бяха тествани бактериална суспензия от клиничен изолат *S. sanguis II* 0.5 MF с два фотосенсибилизатори: цинк- и галий-съдържащи фталоцианини. При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с два интервала на облъчване: 5 и 12 мин.

На фиг. 9 са представени обобщено резултатите от опитите като криви, описващи зависимостта на преживелите бактерии от приложената светлинна доза и фотосенсибилизатора.



**Фиг. 9** Фотодинамична инактивация с Ga и Zn фталоцианинови комплекси (Pc) на клиничен изолат *S. sanguis II* от пациент с хроничен периодонтит.

Бяха наблюдавани следните резултати: микробното число на суспензията *S. sanguis II*, когато е третирана с галий- и цинк-съдържащи фталоцианини намалява с 3 log<sub>10</sub>, при 5 мин. облъчване, а при 12 мин., намалява с 3,5 log<sub>10</sub>. По-добри резултати са показани в проучване на фотодинамичното активиране на референтен щам с метиленово синьо и бенгалско розово, в концентрации съответно 1.25–2.5 µg/ml и 0.62–1.25 µg/ml, при облъчване съответно с 292 µW/cm<sup>2</sup> при 557 nm, 300 µW/cm<sup>2</sup> при 665 nm. В отразените резултати се постига намаление на жизнеността на бактериите с 6 log<sub>10</sub>, при това при инкубиране само за минута (Soria-Lozano et al., 2015).

Двата фотосенсибилизатора имаха приблизително еднакъв ефект, като нито една от изпробваните комбинации багрило/интервал на експозиция не доведе до пълно унищожение на бактериите.

Отново двете графики, отразяващи намалението на микробното число в зависимост от времето на облъчване, започват от обща точка, която отразява трите контроли за двата фотосенсибилизатора.

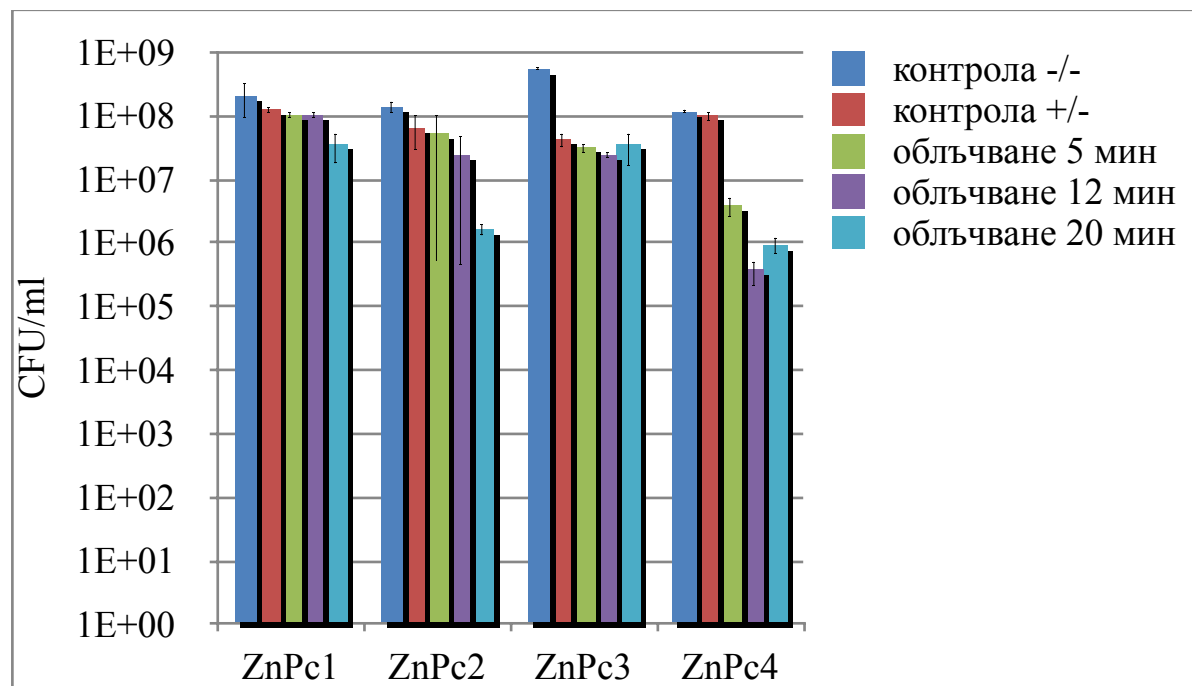
На изолирания клиничен щам беше направена антибиограма, която показва следната чувствителност: Clindamycin (S), Azithromycin (R), Minocycline (I), Chloramphenicol (S), Ciprofloxacin (I). Това означава, че при този пациент най-подходящ за лечение е клиндамицинът, докато макролидите и хинолоните не биха имали ефект. Чувствителността към хлорамфеникола не го прави подходящ поради неговата висока токсичност. Следователно това е още един пример, когато поради резистентност на изолата и чувствителност към по-високо токсични медикаменти може да се предпочете провеждането на ФДТ.

#### **4.2.4. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *A. actinomycetemcomitans***

При този анализ бяха тествани бактериална суспензия на *A. actinomycetemcomitans* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини с концентрация 5 µM: тетра-метилпиридилокси Zn Pc; p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли: светлинна контрола (-/+) - без фотосенсибилизатор, но осветена; тъмнинна контрола (+/-) - с фотосенсибилизатор, но без светлина (за тъмнинна токсичност); бактериална контрола (-/-) - само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор, без светлина). При всеки фотосенсибилизатор беше дадено време за инкубация 5 мин за проникване на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и

работеща при 32 mW.cm<sup>-2</sup>. Определянето на микробното число беше използвано като метод за оценка на въздействието.

На фиг. 10 са представени обобщено резултатите от опитите като стълбцова диаграма. Тя отразява оцелелите бактерии след третиране с различни фотосенсибилизатори и различни времена на облъчване.



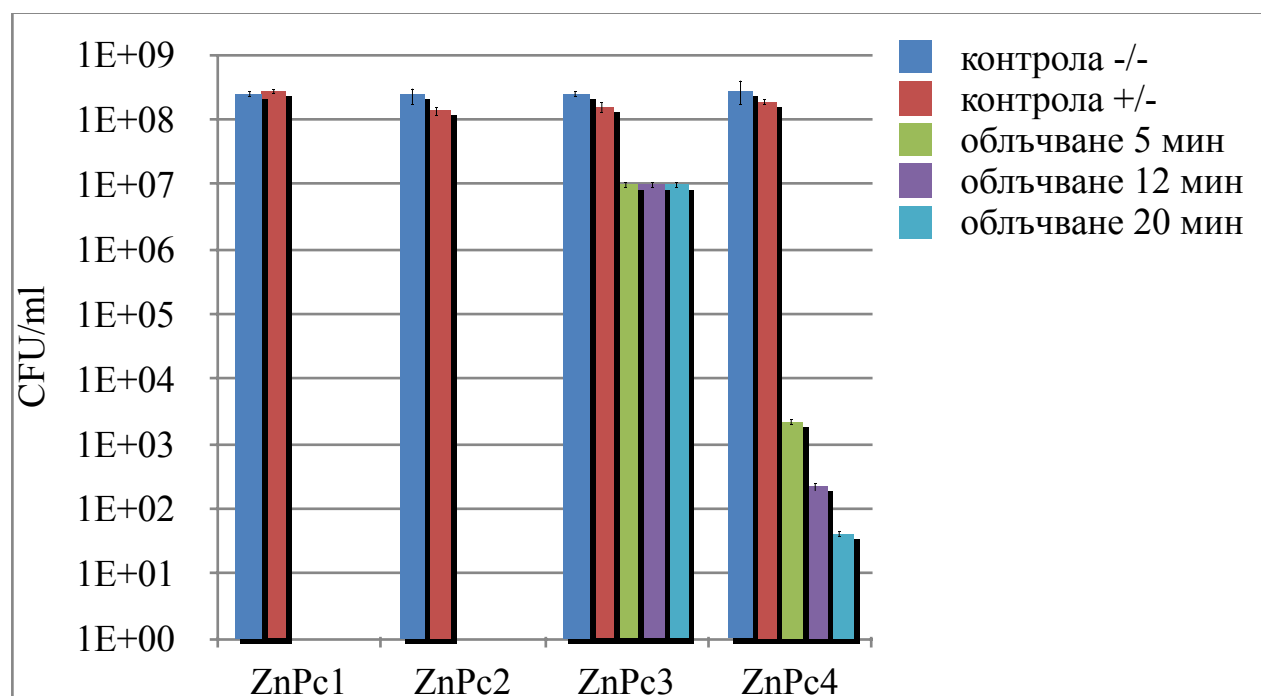
**Фиг. 10** Фотодинамична инактивация на клиничен щам *A. actinomycetemcomitans* с ZnPc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (p-тетра-меркаптопирин Zn Pc); ZnPc3 (n-тетра-меркаптопирин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопирин Zn Pc).

От диаграмата е видно, че при първото и третото съединение няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, независимо от времето на експозиция. При второто съединение няма разлика между резултатите при облъчване на пробите и контролите, при 5 и 12 мин. време на експозиция, но при 20 мин. е постигната редукция с 1,5 log<sub>10</sub>. При четвъртото съединение при 5 мин. време на експозиция е постигната редукция с около 1 log<sub>10</sub>, а при 12 и 20 мин. е постигната редукция с 2 log<sub>10</sub>. Най-силно въздействие върху *A. actinomycetemcomitans* има окта-меркаптопирин Zn Pc.

#### 4.2.5. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *P. gingivalis*

При експерименталната работа беше тествана бактериална суспензия *P. gingivalis* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини с концентрация 5  $\mu\text{M}$ : тетра-метилпиридилокси Zn Pc; р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли: светлинна контрола (-/+ ) - без фотосенсибилизатор, но осветена; тъмнинна контрола (+/-) - с фотосенсибилизатор, но без светлина (за тъмнинна токсичност); бактериална контрола (-/-) - само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор, без светлина). При всеки фотосенсибилизатор беше осигурено време за инкубация 5 мин за проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и работеща при 32  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Определянето на микробното число беше използвано като метод за оценка на ефекта.

На фиг. 11 са представени обобщено резултатите от опитите като стълбцова диаграма. Светлинната контрола -/+ не е показана, поради статистически статистически незначимите разлики в стойностите на микробното число на контролите.



**Фиг. 11** Фотодинамична инактивация на клиничен щам *P. gingivalis* с ZnPc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc3 (n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопиридин Zn Pc).

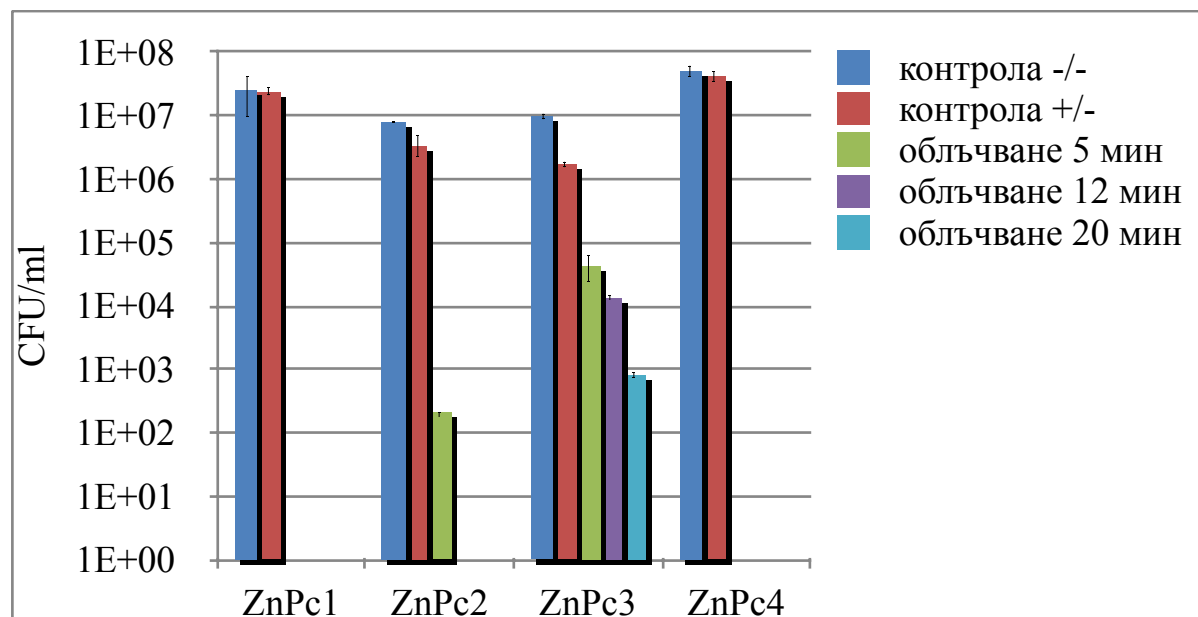
На диаграмата се вижда, че при първото и при второто съединение при 5, 12 и 20 мин. е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При третото съединение при 5, 12 и 20 мин. е постигната редукция с около 1 log<sub>10</sub> и няма зависимост от времето на експозиция. При четвъртото съединение има правопрпорционална зависимост от времето на експозиция, като при 5 мин. е постигнато намаляване на бактериите с 5 log<sub>10</sub> и при следващите времена на експозиция 12 мин и 20 мин. е постигната редукция с по 1 log<sub>10</sub>. Най-силно въздействие върху *P. gingivalis* имат тетра-метилпиридилокси Zn Pc и р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc, но и при окта-меркаптопиридин Zn Pc е постигната редукция с най-малко 5 log<sub>10</sub>, докато п-тетра-меркаптопиридин Zn Pc няма добър ефект.

Проучване *in vitro*, което анализира фотодинамичното инактивиране срещу *P. gingivalis*, използва наличния в търговската мрежа Radachlorin (0.1% Radachlorin®), лазерно устройство InGaAlP при дължина на вълната: 662±0.1% nm, изходна мощност: 2.5 W, енергийна плътност: 6 J/cm<sup>2</sup>, диаметър на влакното: 2 mm) и толуидиново синьо O (концентрация на толуидиново синьо O 0.1 mg/mL, LED устройство при дължина на вълната: 630 nm, изходен интензитет: 2000 mW.cm<sup>-2</sup>, диаметър на върха: 6,2 mm), отчита 3 log и 0.5 log намаление на преживяемостта в сравнение с бактериалната контрола, съответно (Moslemi et al., 2018). В сравнение с експериментите в това изследване при 10.5 J/cm<sup>2</sup>, бактериалната редукция в настоящото проучване е по-голяма - 3,5 log и 8 log, постигната срещу референтния и клиничния щам *P. gingivalis*, съответно с третиране с ZnPc2 и преинкубиране за 5 минути и за ZnPc1 - съответно 2 log и 8 log.

#### **4.2.6. Фототоксичност при микроорганизмови суспензии от клиничен щам *P. intermedia***

При следващите изследвания беше третирана бактериална суспензия *P. intermedia* 0.5 MF с четири фотосенсибилизатори водоразтворими цинкови фталоцианини с концентрация 5 μM; тетра-метилпиридилокси Zn Pc; р-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; п-тетра-меркаптопиридин Zn Pc; окта-меркаптопиридин Zn Pc. За всеки експеримент бяха подготвени контроли: светлинна контрола (-/+ ) - без фотосенсибилизатор, но осветена; тъмнинна контрола (+/-) - с фотосенсибилизатор, но без светлина (за тъмнинна токсичност); бактериална контрола (-/-) - само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор, без светлина). При приложените фотосенсибилизатори беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. За всеки фотосенсибилизатор се проведеха опити с три интервала на облъчване: 5, 12 и 20 мин. с LED лампа с 640 nm дължина на вълната и работеща при 32 mW.cm<sup>-2</sup>. Определянето на микробното число беше използвания метод за определяне на действието.

На фиг. 12 са представени обобщено резултатите от опитите като стълбцова диаграма.



**Фиг. 12** Фотодинамична инактивация на клиничен щам *P. intermedia* с ZnPc1 (тетра-метилпиридилокси Zn Pc); ZnPc2 (p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc3 (n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc); ZnPc4 (окта-меркаптопиридин Zn Pc).

Диаграмата отразява получените резултати и показва, че при първото съединение и при четвъртото съединение при 5, 12 и 20 мин е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При второто съединение при 5 мин е постигната редукция с около 5 log<sub>10</sub>, а при 20 мин и 12 мин е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При третото съединение при 5 и 12 мин се реализира редукция с около 2 log<sub>10</sub>, а при 20 мин редукцията е с около 3.5 log<sub>10</sub>. Най-силно въздействие върху *P. intermedia* има тетра-метилпиридилокси Zn Pc и окта-меркаптопиридин Zn Pc, но и при p-тетра-меркаптопиридин Zn Pc при 10 и 20 мин е постигнато пълно инактивиране на бактериите. При n-тетра-меркаптопиридин Zn Pc е постигната редукция с около 3 log<sub>10</sub> само при 20 мин.

Интерес представлява и в каква степен изследваните фотосенсибилизатори проникват в клетките мишени и как това влияе на техния антибактериален ефект. Едно проучване разкрива, че високо поглъщане в клетките на референтни щамове *P. intermedia* и *A. actinomycetemcomitans* се наблюдава за ZnPc 1-4, с най-висока стойност за ZnPc3 и ZnPc4 (Kussovski et al., 2018). Въпреки това, пълно инактивиране е регистрирано за *P. intermedia* след третиране с ZnPc1. Същият факт беше доказан в настоящото изследване при подобни светлинни дози. *A. actino-*



*mycetemcomitans* е по-малко податлив на ФДТ и за разлика от настоящото проучване, където ZnPc3 е най-ефективният фотосенсибилизатор, е докладван ZnPc1 (Kussovski et al., 2018). Изглежда, че няма силна връзка между поглъщането и ефекта и по някакви причини различни бактериални щамове, в рамките на един и същи бактериален вид, проявяват различна толерантност към фотодинамичната терапия.

В почти всички експерименти с пародонтопатогените не е наблюдавана статистически значима разлика между бактериалната контрола, тъмната контрола и светлата контрола (данните не са показани), с изключение на контролите, съдържащи ZnPc3, където намаление с един log е наблюдавано само за клиничните щамове на *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia* и референтния щам на *P. gingivalis*. Постигната е различна степен на въздействие, като то изглежда, че зависи от 1) химическата структура на фталоцианините, като заместителите на р-позиция са по ефективни от заместителите на п-позиция, 4-заместените съединения са по ефективни при *P. intermedia* и *P. gingivalis* от 8-заместените съединения. Обратното е при *A. actinomycetemcomitans*; 2) дозата на светлината, като по-дългия интервал на облъчване е по-ефективен; 3) микробните видове, като *P. intermedia* и *P. gingivalis* са по-чувствителни от *A. actinomycetemcomitans* и в повечето случаи клиничните изолати на *P. intermedia* и *P. gingivalis* са дори по-податливи.

В опитите до тук, като тестов обект са използвани бактериални суспензии, но на практика бактериите в организма се организират в биофилми, като в тези структури проявяват повишена резистентност към антибиотици и други увреждащи агенти. Поради това, за да се потвърди лечебния потенциал на ФДТ при заболявания с участието на бактерии в денталната медицина, изследванията ни продължиха в тази насока.

### **4.3. Фототоксичност при биофилми**

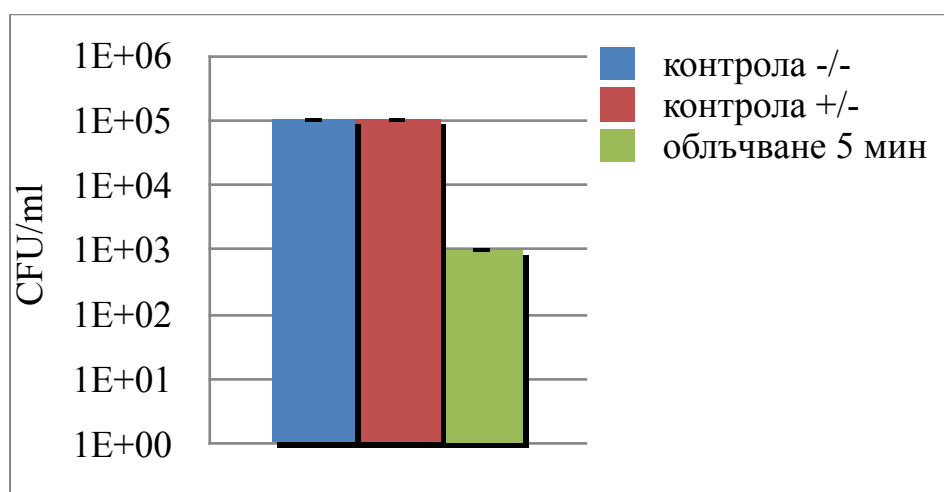
#### **4.3.1. Фототоксичност при биофилми, получени от MRSA**

Вирулентността на стафилококите до голяма степен се дължи на образуването на биофилми, което ги предпазва от действието на имунната система и повишава устойчивостта им към фагоцитоза и антибиотици.

При научното проучване бяха тествани 48-часов биофилми MRSA с алуминий-съдържащи фталоцианини, като фотосенсибилизатор. Беше дадено време за инкубация 5 мин., осигуряващо проникването на багрилото в клетките. Интервалът на облъчване беше 5 мин., а като източник на светлина беше използван лазер с дължина на вълната 660 nm и оптично влакно, провеждащо светлината в кореновите канали. Бяха наблюдавани следните резултати: микробното число на суспензията,

получена от биофилма, когато е третирана с алуминий-съдържащи фталоцианини намалява с  $2 \log_{10}$  при 5 мин. Експозиция.

На фиг. 13 са представени получените резултати. Първият стълб, отразяващ контролата -/- е  $10^5$  CFU/ml. Също толкова е и контролата +/-, което означава, че фотосенсибилизаторът без да е активиран от светлина няма токсичен ефект. При проучване за действието на ФДТ в инактивацията на бактериите в биофилмите, което изследва действието на толуидиново синьо O – катионно фенотиазиново багрило, върху жизнеспособността и структурата на биофилмите на MRSA, е наблюдавана значителна инактивация на клетки, когато стафилококовите биофилми са били подложени на едновременното въздействие на толуидиново синьо O и лазер. Ефектът е дозозависим от лъчението. Конфокалната лазер-сканираща микроскопия потвърждава увреждането на мембраните на бактериалните клетки, които са подложени на ФДТ (Sharma et al., 2008).



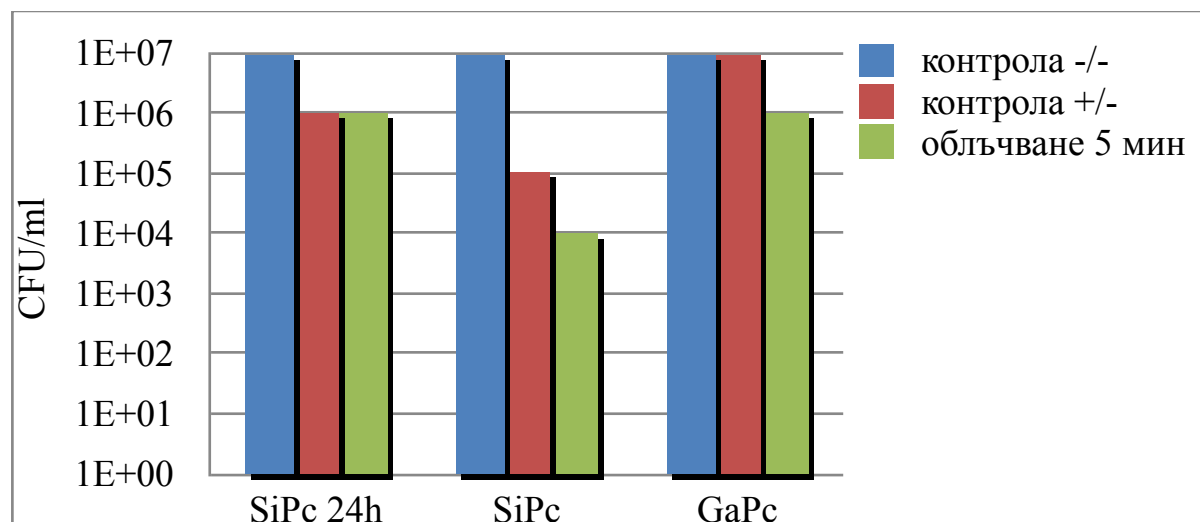
**Фиг. 13** Фотодинамична инактивация на 48 ч. биофилм MRSA с Al Pc и 5-минутна експозиция.

При проучване, при което се сравнява действието на малахитово зелено с фенотиазиновите фотосенсибилизатори (метиленово синьо и толуидиново синьо) върху биофилми от *S. aureus*, биофилмите са били подложени на ФДТ, при която са използвани 660 nm диоден лазер и концентрации на фотосенсибилизаторите от 37.5 до 3000  $\mu\text{M}$ . Най-добри резултати са постигнати със средна концентрация 300  $\mu\text{M}$  метиленово синьо с микробна редукция  $0.8\text{--}1.0 \log_{10}$ , 150  $\mu\text{M}$  толуидиново синьо, с микробна редукция от  $0.9\text{--}1.0 \log_{10}$ ; и 3000  $\mu\text{M}$  малахитово зелено с микробна редукция от  $1.6\text{--}4.0 \log_{10}$  (Vilela et al., 2012). Фталоцианинът от

настоящата работа показва по-добри резултати от фенотиазините и по-слаб ефект от малахитовото зелено.

#### 4.3.2. Фототоксичност при биофилми, получени от *E. faecalis*

При следващите опити бяха изследвани и *E. faecalis* биофилми с Ga и Si-съдържащи фталоцианини, като фотосенсибилизатори. Беше дадено време за инкубация 5 мин., което да осигури проникването на багрилото в клетките. Интервалът на облъчване беше 5 мин., а като източник на светлина беше използван лазер с дължина на вълната 660 nm и оптично влакно, провеждащо светлината в кореновите канали. Наблюдаваните резултати са представени на фиг. 14. Трите групи колонки отразяват резултатите, получени при три комбинации от параметри.



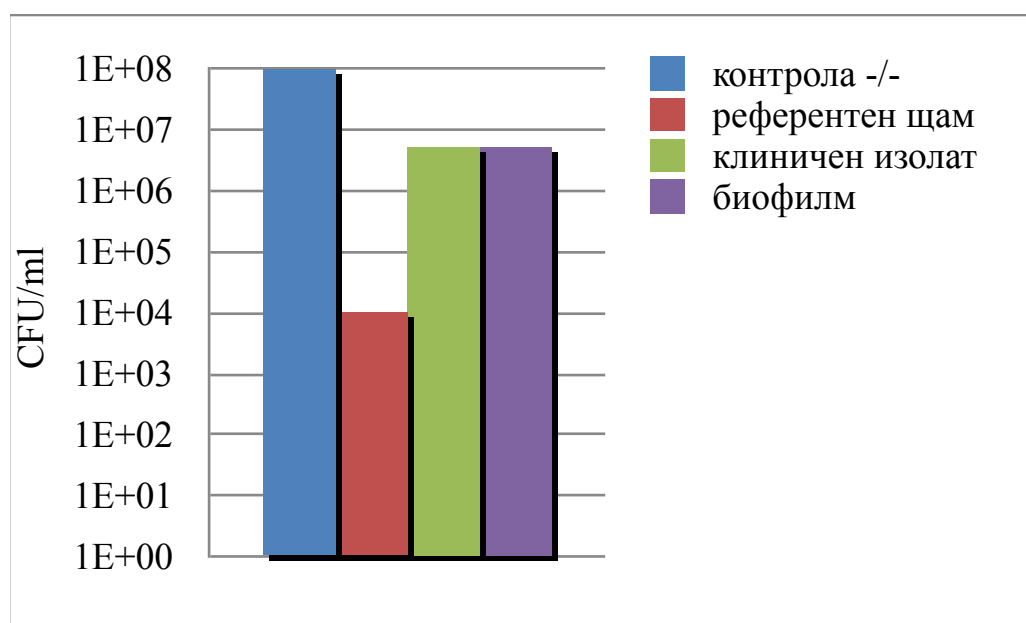
**Фиг. 14** Фотодинамична инактивация на *E. faecalis* биофилм с Ga и Si фталоцианинови комплекси (Pc) и 5- минутна експозиция.

Първата комбинация е въздействие върху 24-часов биофилм със силициев фталоцианин като фотосенсибилизатор. Първата колонка отразяваща контрола -/- е  $10^7$  CFU/ml, втората колонка, отразяваща контрола +/- е  $10^6$  CFU/ml, също толкова е и пробата, което означава, че фотосенсибилизаторът без и с активация от светлина има еднакъв токсичен ефект при млад биофилм.

Втората комбинация е въздействие върху 48-часов биофилм със силициев фталоцианин като фотосенсибилизатор. Първата колонка, отразяваща контрола 1 е  $10^7$  CFU/ml, втората колонка, отразяваща контрола 2 е  $10^5$  CFU/ml, а пробата е около  $10^4$  CFU/ml, което означава, че фотосенсибили-

заторът има токсичен ефект на тъмно, но той е по-слаб от ефекта при светлинна активация.

Третата комбинация е въздействие върху 48-часов биофилм с галиев фталоцианин като фотосенсибилизатор. Първата колонка отразяваща контрола -/- е  $10^7$  CFU/ml, също толкова е и втората колонка, отразяваща контрола +/-, а пробата е  $10^6$  CFU/ml, което означава, че фотосенсибилизаторът няма токсичен ефект на тъмно и при светлинна активация понижава 10 пъти микробното число на биофилма. Резултатите от настоящата работа са по-слаби от проучване на фотодинамична терапия при използване на толуидиново синьо, лазер/LED, дължина на вълната – 660 nm, с мощност – 50 mW и използвана енергия – 6,4 J, което показва 99,9% редукция на микробното число на *E. faecalis* от 48-часов биофилм (Fonseca et al., 2008). Друго изследване на влиянието на фотодинамичната терапия с метиленово синьо в концентрация 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , отново върху биофилм на *E. faecalis* 72-часов, образуван върху екстрахирани, еднокоренови зъби, с диоден лазер с мощност 1 W и дължина на вълната 665 nm показва 77.5% успеваемост в елиминирането на микроорганизма (Foschi et al., 2007).



**Фиг. 15** Сравнение на въздействието на ФДТ според мишената: представено е фотодинамично инактивиране с галиев фталоцианин за 5 мин на три варианти на *E. faecalis*- референтен щам, клиничен изолат и биофилм.

Ако се сравни ефекта на ФДТ с галиев фталоцианин върху три биологични варианти на *E. faecalis*, което е представено на фиг. 15, се

вижда че по-слаб е ефектът при клиничния щам и биофилма. Това може да се обясни с по-сложната структура на биофилма и наличието на фактори, осигуряващи по-голяма издръжливост на външни въздействия при клиничния изолат.

Бактериите са честа причина за заболявания в устната кухина (Meyer и Fives-Taylor, 1998; Kanaki et al., 2021). В настоящата докторска работа са обхванати широк спектър от микроорганизми, причинителите на заболявания, които се разпростират в областта на устата, зъбите и челюстта: от кариозни лезии (*S. salivarius*), през заболявания на пародонта (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*), ендодонтити (*E. faecalis*) до бактериални инфекции на меките тъкани (*S. aureus*, *C. albicans*), които нерядко са във връзка помежду си и се обуславят взаимно. В ежедневната практика борбата с тези причинени от бактерии заболявания и отстраняването на техните последствия представляват основна задача за стоматолозите (Meyer и Fives-Taylor, 1998; Wilson, 2001; Amato, 2023).

Избягването на резидуален кариес, съответно на рецидив на кариеса, който може да възникне от останали микроорганизми или инсуфициентни obturationни ръбове, е централен аспект в стоматологичната наука (Pereira-Cenci et al., 2009; Thomé et al., 2009; Warreth, 2023). Преди всичко за получаване на възможно най-дългоживеещи реставрации необходима предпоставка е чистият откъм бактерии кавитет (Sepetcioglu и Ataman, 1998; Duque et al., 2009; Cheng et al., 2022).

Екסקавацията на заболяла твърда зъбна тъкан и последващата дезинфекция на възникналите емайлови и дентинови повърхности все още са най-често използваните методи за получаване на чист и свободен от микроби кавитет. Тогавя в ежедневната практика се появява проблема на прекалената обработка, когато със стоматологични инструменти се отнеме прекалено много зъбна субстанция, съответно здрави тъкани (Koubi и Tassery, 2008; Lavespere et al., 1996; Warreth, 2023). При това при дълбоките лезии често се стига до дразнене на зъбната пулпа и понякога дори до нейното отваряне, което отново носи след себе си допълнителна нужда от обработка (Auschill et al., 2009; Koolhoven и Plasschaert, 2003; Warreth, 2023). За да се противостои на това се опитват нови, базирани на ултразвукова абразия или на действието на лазерната светлина методи за препарация, за да се отстрани селективно заболялата тъкан (Stiesch-Scholz и Hannig, 2000; Jepsen et al., 2008; Koubi и Tassery, 2008; Kornblit et al., 2009; Besegato et al., 2022). Често тези подходи вървят с повишени времеви, материални или финансови разходи както за лекаря, така и за пациента. В част от експериментите на това научно изследване беше използвана фотополимерна лампа, с която разполага всеки стоматологичен кабинет, т.е. новосинтезираните фотосенсибилизатори могат да се активират със светлина, която е със същата дължина на вълната, както

обичайно наличните фотополимерни лампи и следователно не е необходимо закупуване на нова апаратура.

Също така, при терапията на заболяванията на пародонта, останалите във венечните джобове и в околните меки тъкани микроорганизми са причина за рецидивиращи пародонтопатии (Matuliene et al., 2008; Citterio et al., 2022). От тук следва, че за една успешна обработка трябва да се стремим към последваща редукция на патологичните микроорганизми във венечните джобове. Добре се отразява механичното отстраняване на субгингивалните конкременти с помощта на ултразвукови устройства или с използване на кюрети и скалери с последваща дезинфекция чрез измиване със субстанции като хлорхексидин, който осигурява дълго продължаващ ефект (Cousido et al., 2010; Garcia-Caballero et al., 2009; Tomás et al., 2009, Brookes et al., 2020). Подобно на екскавацията на кариозен дентин, отстраняването на субгингивални конкременти върви със загуба на здрав коренов цимент, съответно коренов дентин, което може да доведе до отслабване и евентуално травматизиране на зъба. При особено тежки случаи на пародонтално възпаление се дават системно антибиотици, за да се възвърне преобладаващо патологичният микробен спектър във физиологичен и съответно да се редуцира броят на бактериите. Като недостатък при антибиотичната терапия се наблюдават настъпване на медикаментозна непоносимост и странични реакции при пациента, както и развитие на гени на резистентността при бактериите (Pahkla et al., 2006; Renvert et al., 2004, 2006, 2008, 2009; Moreira и Feres-Filho, 2007; Haque et al., 2022).

Фотодинамичната антимикробна химиотерапия има потенциал да бъде алтернатива на антибиотичната терапия, особено за повърхностно локално третиране на инфекции в устната кухина. Развитието на резистентност към този метод изглежда малко вероятно, тъй като синглетният кислород и свободните кислородни радикали взаимодействат с различни клетъчни структури, намиращи се в микробната клетка и с различни метаболитни пътища (Marasini et al., 2021). Така, този вид терапия е еднакво ефективна към антибиотично-чувствителни и резистентни бактерии, а повторното въздействие не води до селектиране на резистентни щамове (Maisch, 2020). Супероксид дисмутаза и каталазата протектират от някои кислородни радикали, но не и от синглетния кислород (Кнопка и Goslinksi, 2007). Освен това друго предимство е избягването на системното приложение на лекарства с всички възможни усложнения за пациента, произтичащи от това. При ФДТ третирането е локално и като евентуален проблем може да се отчете спирането на действието при спиране на облъчването (Dai et al., 2009).

Съществуват повече от 330 публикации, публикувани през последните 20 години, относно ФДТ, медирана от метиленово синьо, които показват

широк диапазон на бактериална редукция, в зависимост от използвания източник на светлина, дозата и излъчването на използваната светлина, както и вида на патогена (Piksa et al., 2023). Например, в тази научна разработка тетра-метилпиридилокси Zn Pc показва фотодинамична инактивация при различни видове микроорганизми-*S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* и *S. salivarius*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, а освен това се установи по-голямо намаляване на микробното число на *E. faecalis* и *C. albicans* в сравнение с метиленово синьо (Gueorgieva et al., 2010; Angelov et al., 2011). Обаче ефектът спрямо *A. actinomycetemcomitans* не беше добър, затова тъй като в оралните инфекции участват голямо разнообразие от микробни видове, един подход би могло да бъде прилагане на комбинация от два или повече фотосенсибилизатори. Също така може да се обмисли тестване на повече щамове, за да се определи статистически коя може да бъде правилната доза светлина и фотосенсибилизатор за конкретен щам. Доколкото ни е известно, до момента такива данни няма.

Не са за пренебрегване и показатели, такива като комфорта на пациентите. По тази причина, имайки предвид работните протоколи за вече одобрени фотосенсибилизатори за приложение в денталната медицина, подходящи са тези съединения, които показват добър ефект при по-кратки периоди на инкубация и осветяване (Doychinova et al., 2017; Shahbazi et al., 2022). Според получените резултати, сред изпитваните фотосенсибилизатори, ZnPc1 и ZnPc2 разкриват потенциал да изпълнят тези изисквания при лечение на хронични пародонтити.

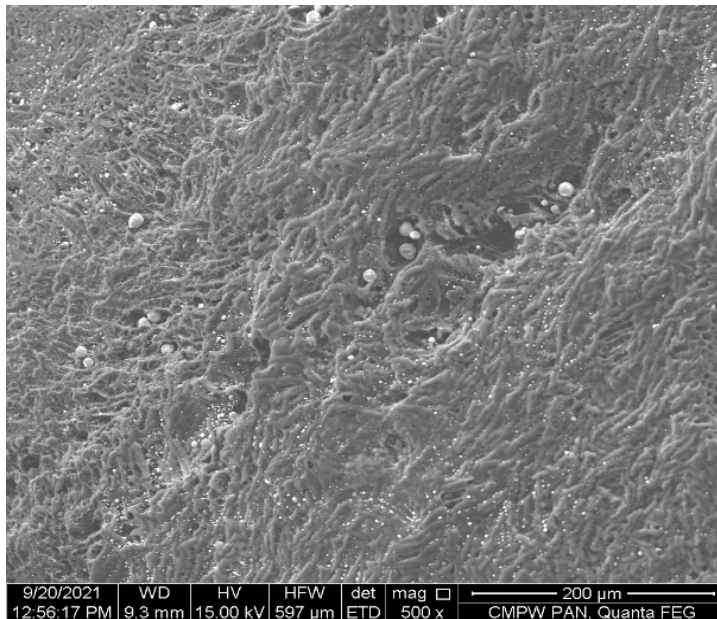
#### **4.4. Структурна характеристика на новополучените композити.**

Изясняването на структурата на новополучените метал-въглеродни композити е от ключова роля за изясняване на механизмите на въздействие върху микроорганизмите и свойствата на материалите като цяло. Приложените методи за охарактеризиране на изследваните продукти и материали са сред най-съвременните, съгласно най-модерните тенденции при научните експериментални апаратури.

##### **4.4.1. Структурно-морфологичен анализ със сканираща електронна микроскопия (SEM).**

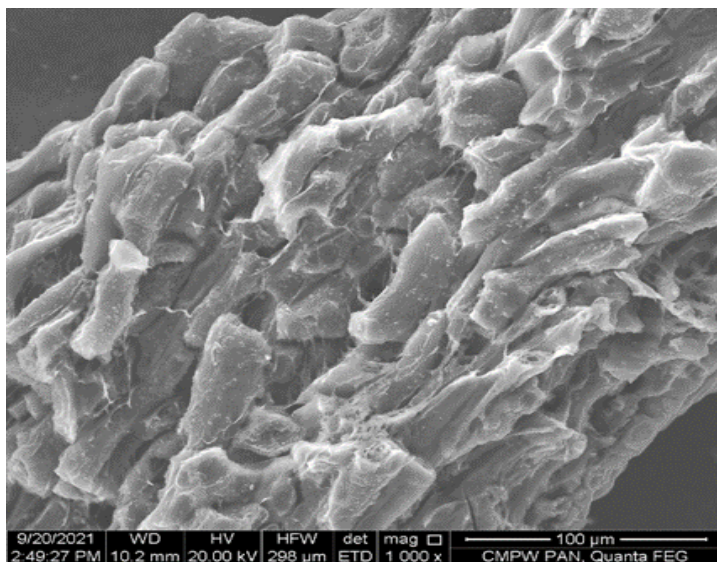
SEM снимките, показани на фиг. 16-18 на металните въглеродни композити, показват наличието на метални наночастици, добре вградени в порите на активния въглен, което е видимо във всички проби. АССАg съдържа два добре разграничени типа еднородни топчести сребърни наночастици, наночастици „малки топки“ (с размер около 1  $\mu\text{m}$ ) и

наночастици „ големи топки “ (около 20  $\mu\text{m}$  ), добре разграничени, видими на снимката на СЕМ (Фиг. 16).



**Фиг. 16** СЕМ изображение на въглероден композит, съдържащ Ag.

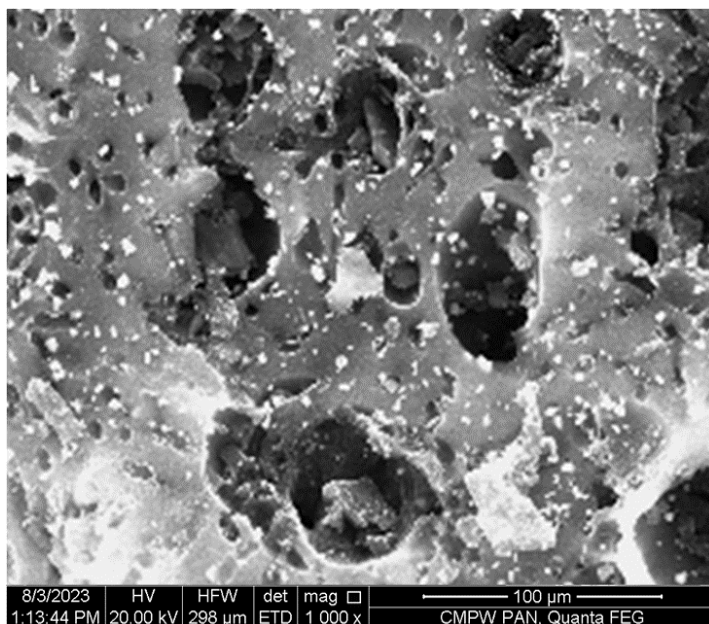
Медните наночастици в АССCu (фиг. 17) също са еднородни сферични структури с размер около 1  $\mu\text{m}$ .



**Фиг. 17** СЕМ изображение на въглероден композит, съдържащ Cu.

АССMg (фиг. 18) съдържа метални наночастици с голямо разнообразие от размери и форми.

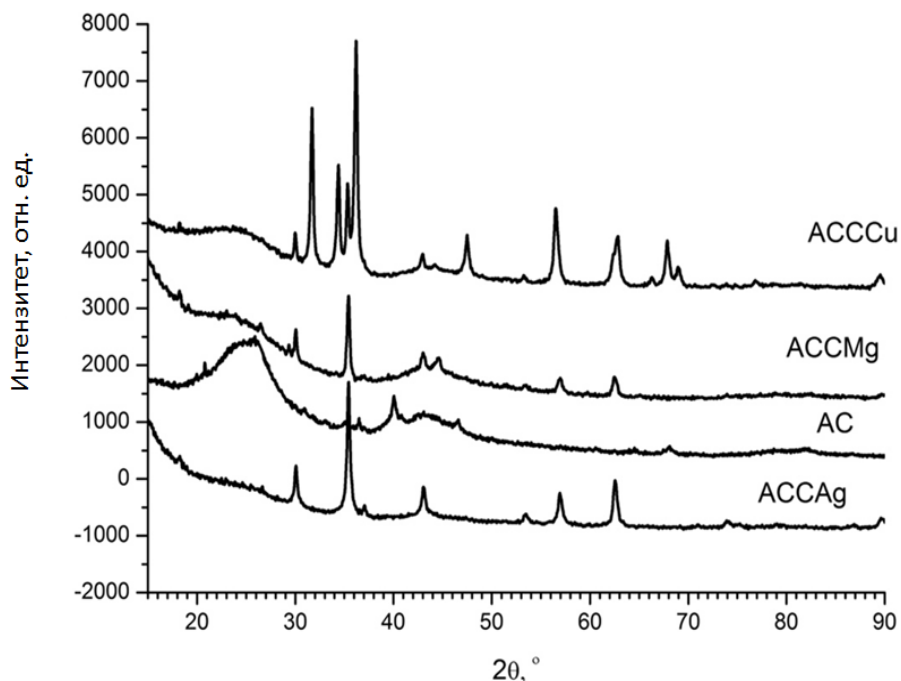




**Фиг. 18** СЕМ изображение на въглероден композит, съдържащ Mg.

#### **4.4.2. XRD изследване**

Данните от XRD (фиг. 19) показват висока степен на графитизация, което се доказва от силно интензивни тесни пикове при  $24^\circ$  и  $44^\circ$ , отговарящи съответно на (002) и (100) рефлексите на 2H-хексагонал кристален графит. Нашите въглеродни материали са аморфни на макрониво, но в на микро- ниво те са изградени от микрокристалити, които се състоят от малки пакети от графитни листове. Позициите на тези два пика съответстват на средните стойности на разстоянията между графитните слоеве (или между въглеродните атоми в посоки, перпендикулярни на листовите), и съответно между въглеродни атоми в слоевете). Позицията и ширината на пиковете са свързани със средните размери на кристалите. Резултатите от XRD потвърждават образуването на метални наночастици върху повърхността на метал-въглеродните композити. Открити са Ag,  $\text{Cu}_2\text{S}$ ,  $\text{CuO}$  и  $\text{MgO}$ . В XRD спектър на  $\text{ACCCu}$ ,  $\text{Cu}$  наночастици бяха открити при  $2\theta = 67^\circ$  (Phul et al., 2018). Има също Ag-съдържащи наночастици при  $2\theta = 32^\circ$  в пробата  $\text{ACCAg}$  (Mehta et al., 2016). За  $\text{ACCMg}$  ивицата при  $2\theta = 46^\circ$  съответства на  $\text{MgO}$  (Safaei-Ghomi et al., 2015).



**Фиг. 19** XRD спектри на въглеродни композити и активен въглен.

#### 4.4.3. Елементен анализ

Композитите съдържат 73,42 % въглерод, 0,52 % водород, 0,24 % азот, 2,78 % сяра, 23,04 % кислород (+ загуби и др.). Те се характеризират с повишено съдържание на въглерод и намалено съдържание на водород. Данните, получени от елементния анализ, показват високо съдържание на сяра, която се внася допълнително от използваните реагенти по-време на синтеза. Повишените съдържания на кислород и сяра се очаква да имат допълнителни антибактериални ефекти. Високото C/H атомно съотношение (11.77) показва относително висока степен на ароматност на изследваните и висока степен на карбонизация, потвърдено от XRD анализа.

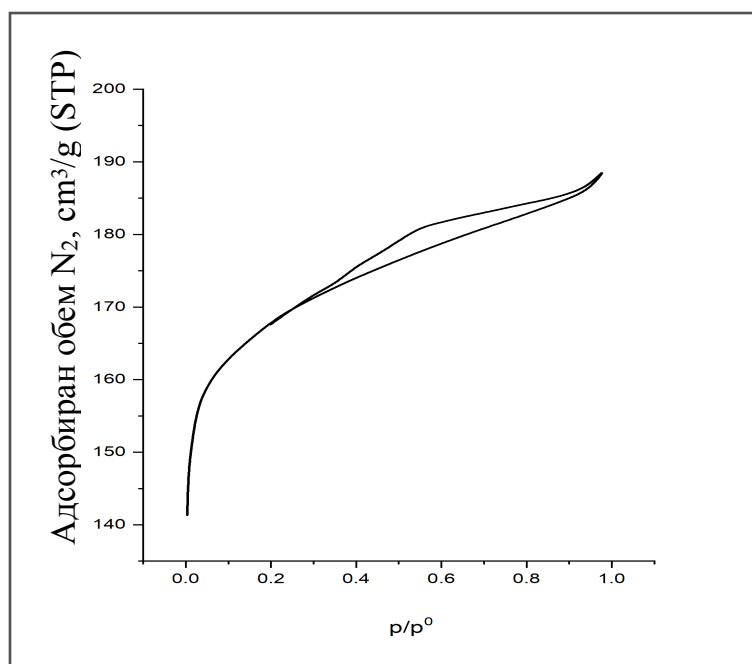
#### 4.4.4. БЕТ анализ

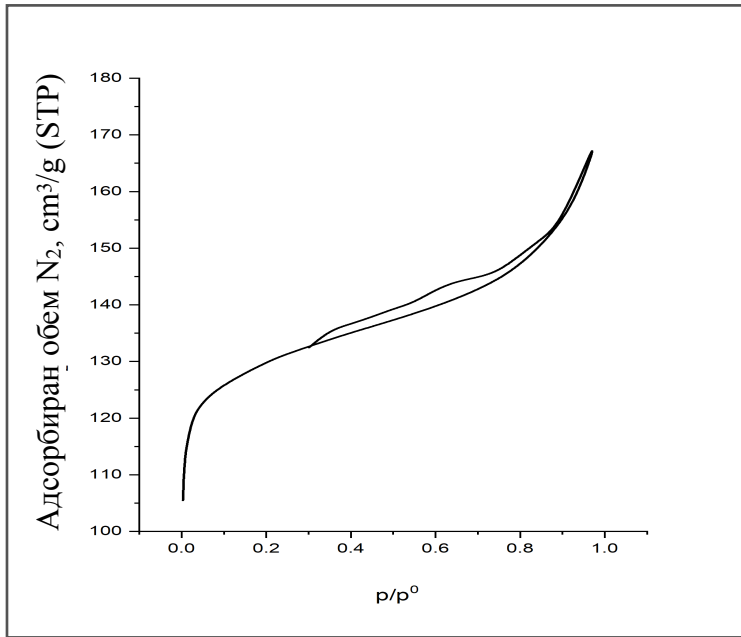
Абсорбционните изотерми на N<sub>2</sub> на всички проби са представени на фиг. 20-23. Пробите се отличават с голяма повърхност и наличие на микро-, мезо- и макропори (Таблица 1).

**Таблица 1** Текстулни параметри на изследваните проби

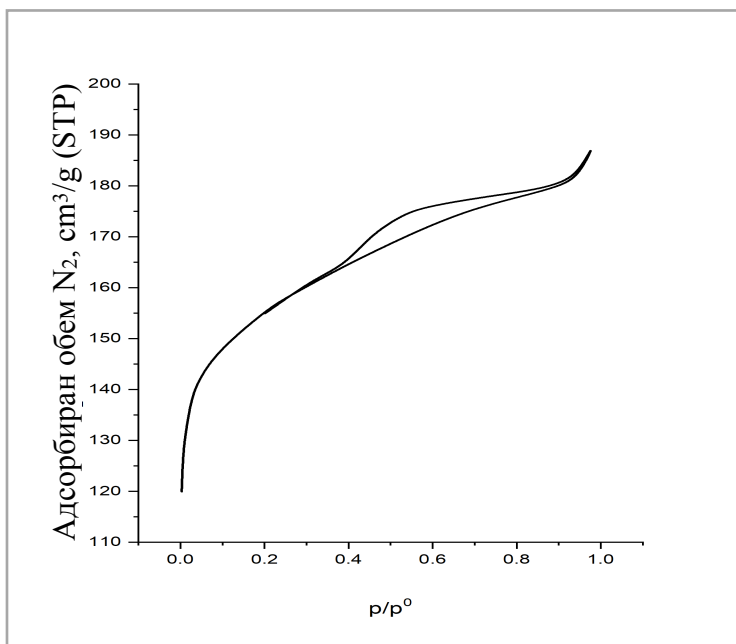
	БЕТ специфична повърхност m <sup>2</sup> /g	V общо пори cm <sup>3</sup> /g	V микропори cm <sup>3</sup> /g	V мезопори cm <sup>3</sup> /g	V макропори cm <sup>3</sup> /g
АС	671	0.350	0.229	0.075	0.055
АССCu	595	0.296	0.194	0.054	0.048
АССMg	511	0.268	0.175	0.053	0.040
АССAg	319	0.219	0.100	0.032	0.044

Съгласно класификацията на IUPAC (Marsh и Rodriguez-Reinoso, 2006), всички изотерми са от смесен I/IV тип, който е хибрид между I и IV тип изотерма. Хистерезисната бримка се вижда ясно в рамото на десорбция при относителни налягания  $> 0.5$  – това може да се дължи на капилярна кондензация на азот в мезопори с правоъгълно сечение (Marsh и Rodriguez-Reinoso, 2006). Видът и размерът на металните наночастици, както и порестата структура на въглерода (установена чрез БЕТ изследвания), определят антибактериалната активност на композитите метал-въглерод.

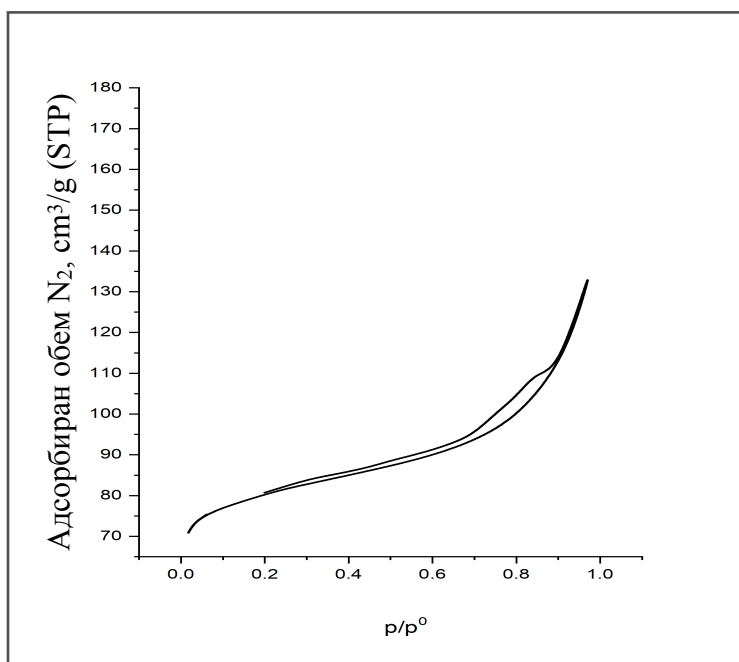
**Фиг. 20** Адсорбционна изотерма на N<sub>2</sub> при 77 K за АС.



**Фиг. 21** Адсорбционна изотерма на N<sub>2</sub> при 77 К за ACCMg.



**Фиг. 22** Адсорбционна изотерма на N<sub>2</sub> при 77 К за ACCCu.

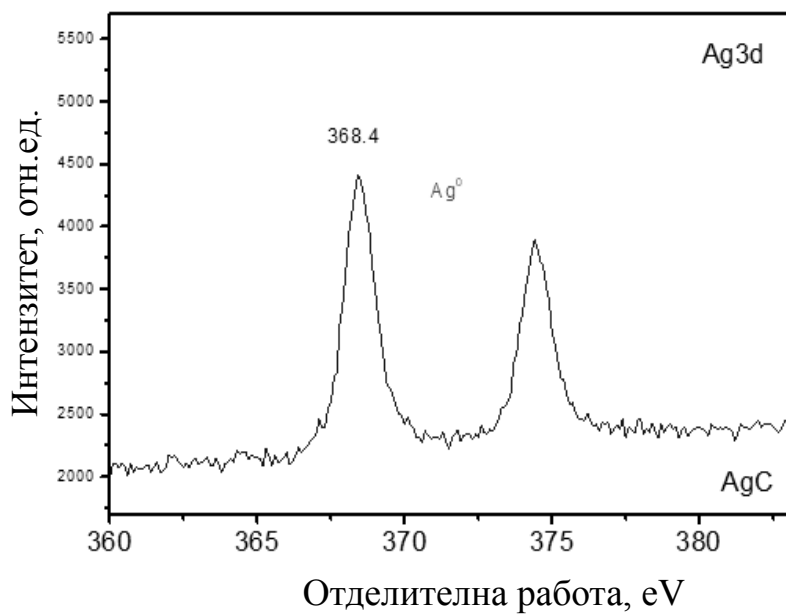


**Фиг. 23** Адсорбционна изотерма на N<sub>2</sub> при 77 К за ACSAg.

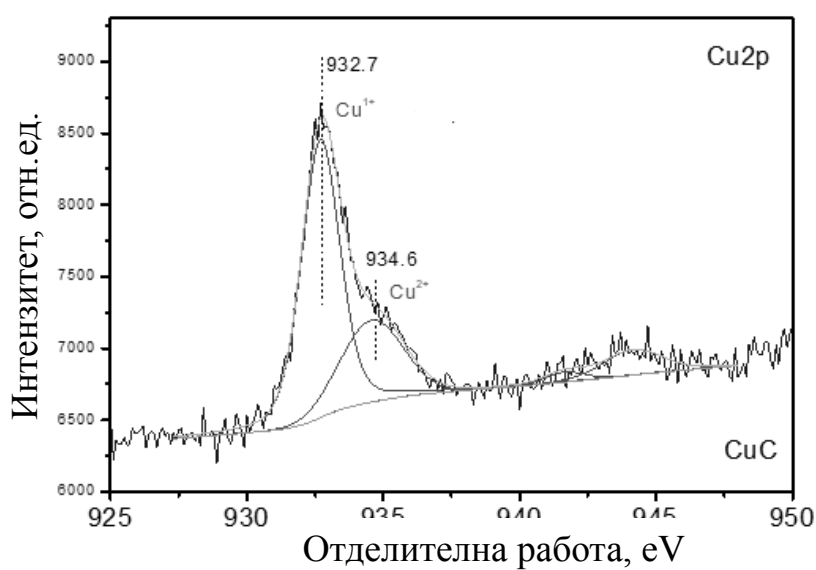
Специфичната повърхност и обемът на порите намаляват след добавяне на метал, поради проникването на метали, метални оксиди и катиони в порите. Този ефект е най-силно изразен при сребърния композит, като намалява през магнезий до мед, което е в съответствие с намаляването на размера на техния атомен и йонен радиус.

#### **4.4.5. Рентгенова фото-електронна спектроскопия (XPS)**

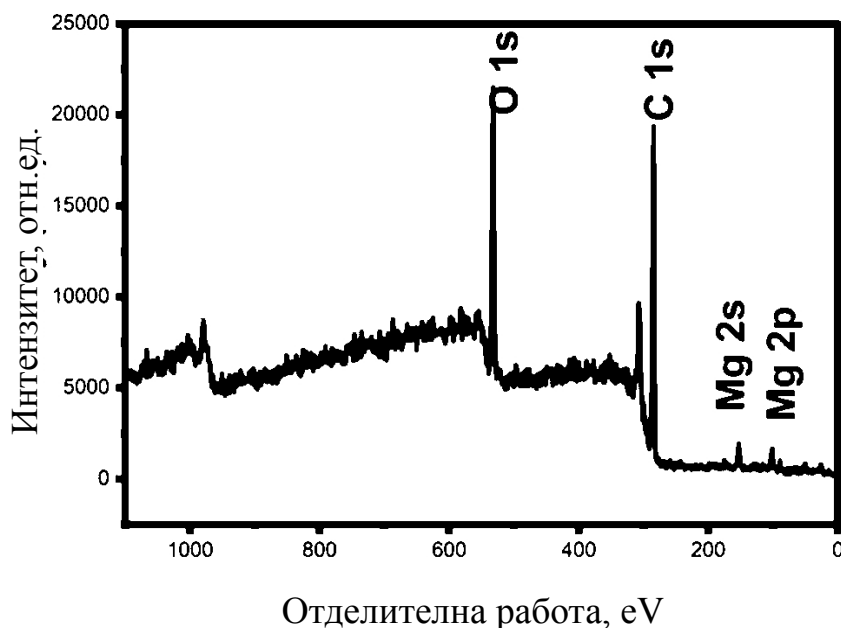
Данните от XPS са представени на фиг. 24-26 и показват наличието на Ag<sup>0</sup> (фиг. 24), мед в координации Cu<sup>+</sup> и Cu<sup>2+</sup> (фиг. 25) в съотношение 2:1, и Mg<sup>2+</sup> (Фиг. 26). Съдържанието, измерено чрез XPS на повърхността на композитите е съответно 12.04 мас. % за Ag, 8.39 мас. % за Cu и 11.20 мас. % за Mg.



**Фиг. 24** XPS спектри на изследваните проби за ACCAg.



**Фиг. 25** XPS спектри на изследваните проби за ACCCu.



Фиг. 26 XPS спектри на изследваните проби за ACCMg.

## 4.5. Антибактериално действие на метал-въглеродните композити.

### 4.5.1. Изпитване на въздействието на въглеродни композити, получени чрез различни методи върху *E. coli* (референтен щам)

Съществуват различни методи за синтез на въглеродни материали. Активирането на въглеродните материали може да се извърши чрез физични и химични методи или комбинация от двата (Azargohar и Dalai, 2008). Химическото активиране се извършва чрез използване на твърди или течни химикали, такива като неорганични киселини ( $H_3PO_4$ ), основи (NaOH), карбонати ( $K_2CO_3$ ) и соли ( $ZnCl_2$ ); реакционната смес се обработва термично в продължение на 2 часа в пещ при 300-500 °C (del Campo et al., 2015).

Освен това могат да се използват различни газове за активиране на въглеродните материали. Газообразните окислителни, такива като пара, въглероден диоксид, кислород или озон при висока температура (600-900 °C) реагират с въглерода чрез разрушаване на ароматните структури в аморфния и кристален въглерод. Често се прилагат водна пара и  $CO_2$  поради ниската им цена и достъпност. При по-ниски температури се предпочита водната пара, тъй като е по-реактивна от  $CO_2$  при дадена температура и молекулата е по-малка, което води до по-добра дифузия,

скорост на реакция и образуване на микропори (Pendyal et al., 1999). Активацията с водни пари води до получаване на продукт с увеличена специфична повърхност и пореста структура, който притежава висок сорбционен капацитет към различни адсорбати (Lima et al., 2010). Активирането с CO<sub>2</sub> води до по-еднотипни пори, докато активирането с водна пара образува голямо разнообразие от микро-, мезо- и макропори, което определя широкото приложение на получения въглероден продукт.

Термохимичната обработка може да се извърши и с O<sub>2</sub>, Cl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, въздух и др. Окисляването с кислород и въздух се използва за модифициране на свойствата на въглерода и увеличаване на съдържащите кислород повърхностни групи, играещи роля в процеса на адсорбция (Budinova et al., 1994).

Основните методи за нанасяне на метал върху носителя, в случая активен въглен, са йонен обмен и импрегниране (Bahareh et al., 2017). Йонният обмен е бавен равновесен метод, затова импрегнирането, което е по-бързо и води до по-високо съдържание на метал, е предпочетен подход в тази научна разработка.

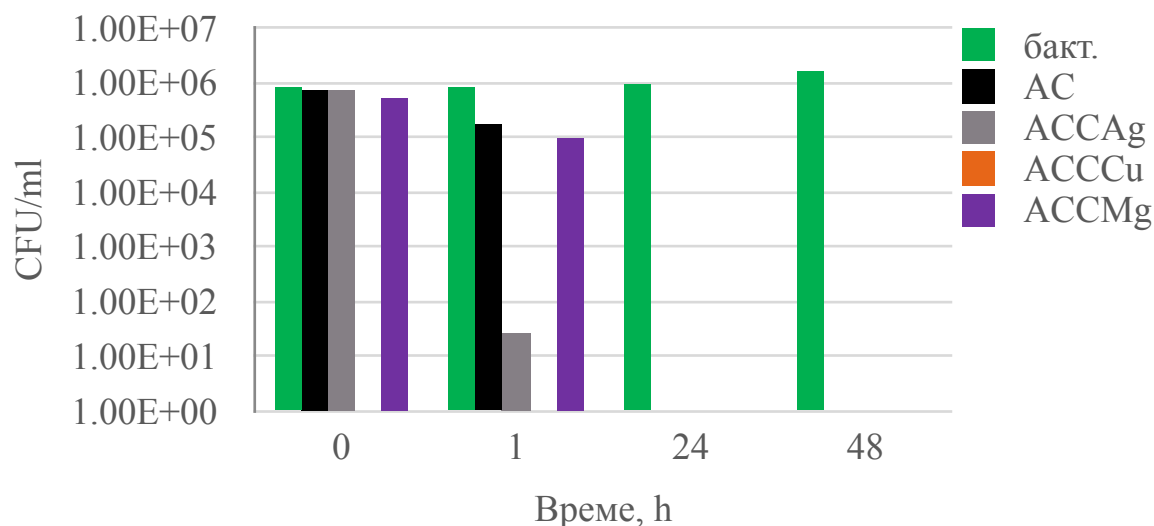
С оглед на гореизложеното, използваните методи в настоящото проучване са хидро-пиролиз, твърдофазен синтез и физическо активиране.

В нашето изследване избрахме да комбинираме получените по трите метода активни въглени с наночастици, т.е. от всеки метод има по три композити, включващи Ag, Cu и Mg. Новосинтезираните композити бяха тествани срещу референтен щам *E. coli*. Разтвор, който съдържа само бактериалния щам и бактериален разтвор с активен въглен бяха използвани като първа и втора контрола, за да се гарантира, че антимикробният ефект се дължи изключително на композитите. Пробите са взети и поставени при различни времена на експозиция - 0, 1, 24 и 48 часа. Получените метал-въглеродни композити бяха подложени на антимикробен анализ.

В резултат на различните приложени методи на получаване, установихме следните резултати за антимикробно действие, представени на (фиг. 27-29).

Фигура 27 е хистограма, представяща бактериалната концентрация на *E. coli* (CFU/ml) като функция от времето на контакт (0, 1, 24 и 48 часа) с композити, синтезирани чрез хидропиролиз. Микробният брой на първата контрола остава в диапазона от 0.8-1.7x10<sup>6</sup>, което показва, че клетъчната смърт не е настъпила естествено и бактериите най-вероятно са в стационарна фаза по време на периода на тестване. По отношение на втората контрола след 1 час експозиция, микробният брой намаля около 10 пъти и на първия и втория ден не бяха открити жизнеспособни бактерии в разтвора. Това може да се обясни с факта, че самите характеристики, които правят активния въглен толкова ефективен филтър, го правят и гостоприемни за бактерии. Бактериите или вирусите лесно полепват по





**Фиг. 27** Антибактериален ефект на ACCAg, ACCCu и ACCMg, получени чрез хидропирилиз срещу *E. coli* ATCC 25922.

порите на активния въглен, който ги задържа, но не ги убива. По отношение на последното, някои проучвания показват, че порите на активния въглен, използвани за обработка на питейна вода, са силно заети от микроби, докато други изследователи разкриват, че бактериите, прикрепени към активния въглен, могат да бъдат устойчиви на хлориране (Sommer et al., 1999; Gagnon et al., 2005), поради образуването на биофилми. Когато бактериите колонизират повърхността на активния въглен, те произвеждат слизест биофилм - струпване на микроорганизми и извънклетъчни протеини, ДНК и захари, секретирани от клетките, който покрива въглеродния материал (Trogolo, 2011).

Така можем да приемем, че с напредването на времето повече бактерии напускат разтвора и населяват активния въглен и тяхната адхезия към композитите е причина за произтичащото намаляване на бактериите. Тази хипотеза трябва да бъде допълнително проучена, например с оцветяване за мъртви/живи бактерии и конфокална флуоресцентна микроскопия.

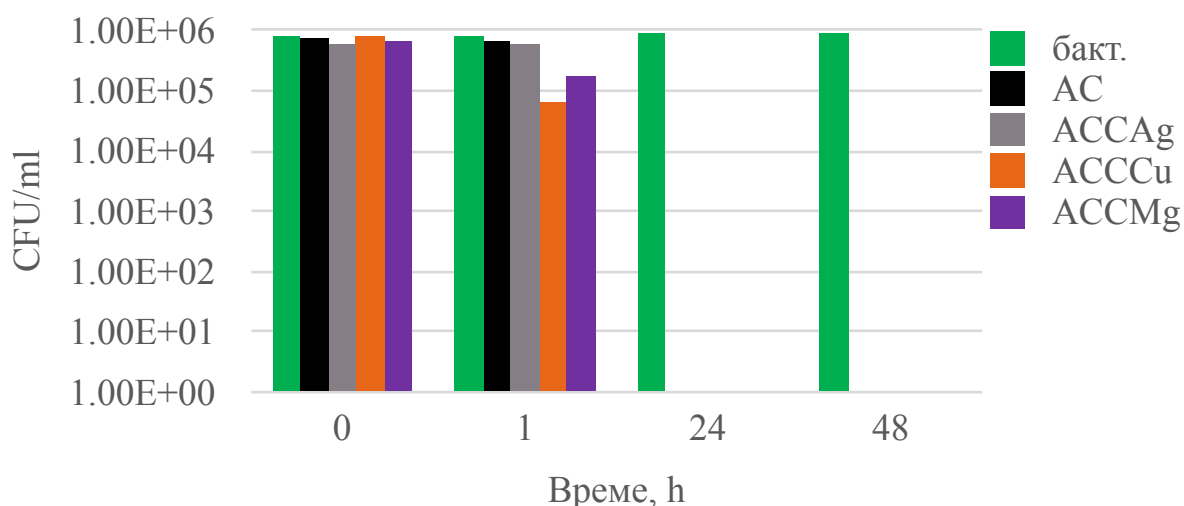
Процентното намаление (% R) на *E. coli* при различно време на контакт беше определено по отношение на бактериалната контрола при време на контакт  $T_x$ , съответно. Данните са показани в таблица 2.

**Таблица 2** Процентно намаление (% R) на *E. coli* при различен метал (Ag, Cu и Mg) и в различно време за контакт.

Проба	%R (t=0h)	%R (t=1h)	%R (t=24h)	%R (t=48h)
АС	7.4	77.5	100	100
АССAg	9.9	99.9	100	100
АССCu	100	100	100	100
АССMg	35.6	87.5	100	100

Най-добър антибактериален ефект срещу *E. coli* се наблюдава, когато се използва 10% АССCu със 100% намаление на микробното число в началната точка. Само АССAg и АССMg и активен въглен показват същия ефект след 24 часа. Резултатите показват, че антибактериалната активност зависи от времето на контакт и естеството на метала. Нашите резултати са подобни и подкрепят резултатите от други проучвания, при които към активният въглен са добавени Ag (Yoon et al., 2008; Joshi et al., 2022), Cu (Chanthee et al., 2022; Mahlangu et al., 2022) и Mg (Tahir et al., 2023). Пълна съпоставка на данните не е възможна, тъй като от някои автори е приложен дисково-дифузионния метод, който се различава от използвания от нас метод. Въпреки това, се установява същата тенденция.

Фигура 28 е хистограма, представяща бактериалната концентрация на *E. coli* (CFU/ml) като функция от времето на контакт (0, 1, 24 и 48 часа) с композити, синтезирани чрез твърдофазен синтез.



**Фиг. 28** Антибактериален ефект на АССAg, АССCu и АССMg, получени чрез твърдофазен синтез срещу *E. coli* ATCC 25922.

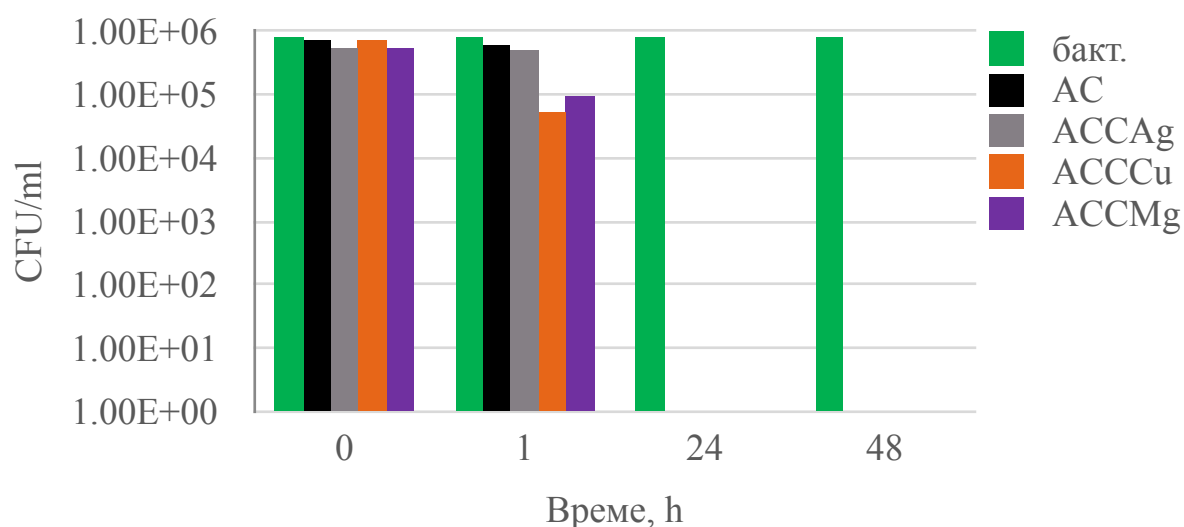
Твърдофазният синтез е осъществен, като е използван прекурсор-полимерни поливинилцелулозни отпадъци. Този процес на синтез на

твърда фаза позволява въвеждането на хетероатоми (атоми, различни от С - S, N, O, метали) в структурата и обема на въглеродните композити, докато, например, при импрегниране, йонообмен, пиролиза със спрей и други методи, металните частици и йони се задържат главно на повърхността.

Най-добър антибактериален ефект срещу *E. coli* се наблюдава отново, когато се използва 10% АСССu, но намалението на микробното число е само с 10% след 1 час. След 24 часа не беше установен бактериален растеж на посявките от пробите, с изключение на бактериалната контрола. Резултатите показват, че добавянето на метални наночастици във вътрешността на композита не допринася за увеличаване на антибактериалния ефект на материала. Вероятно взаимодействието с микроорганизмите се извършва най-активно на граничната повърхност.

Третият метод използва физическо активиране с CO<sub>2</sub>. При физическата активация, се получава въглероден материал с еднородни по размер пори, за разлика от хидропиролиза, който води до формиране на пори в широк диапазон.

Фигура 29 е хистограма, представяща бактериалната концентрация на *E. coli* (CFU/ml) като функция от времето на контакт (0, 1, 24 и 48 часа) с композити, синтезирани чрез физическо активиране.



**Фиг. 29** Антибактериален ефект на ACCAg, ACCCu и ACCMg, получени чрез физическо активиране срещу *E. coli* ATCC 25922.

В резултат на различните приложени методи установихме близки стойности за въздействието им, като то е най-забележимо при АСС, съдържащи мед около 10 мас. % (доказано чрез XPS по-горе), получени чрез едноетапния хидропиролиз. Този метод е оригинален метод за пиролиз на различни прекурсори – въглищни отпадъци, суровини от растителен произход, полимери и др., и е разработен в лаборатория

„Химия на твърдите горива” към Института по органична химия на БАН. При него се получава въглероден адсорбент със силно развита порьозна структура и висока адсорбционна способност. Новият метод за получаване на въглеродни адсорбенти е едностадийен, т.е. съчетава процесите на карбонизацията и активация с водна пара и се провежда при сравнително ниски температури (500-600 °C), което го прави икономически много по-изгоден. Също така това и използването на отпадъци като изходна суровина, освен че намалява себестойността на крайния продукт има и екологичен аспект, т.е. може да се счита за зелена технология.

Хидропиролизът води до образуване на въглероден материал, съдържащ голямо количество (брой и обем) пори в широк диапазон - микропори (< 2 nm), мезопори (2-50 nm) и макропропорции (> 50 nm). Наличието на пори на повърхността на нанопорестите въглеродни материали определя техните отлични адсорбционни свойства към малки атоми, молекули, йони, бактерии и др., в газообразна и течна среда. Локализацията, координацията и свойствата на тези метални частици и йони са ключът към тяхната антибактериална активност.

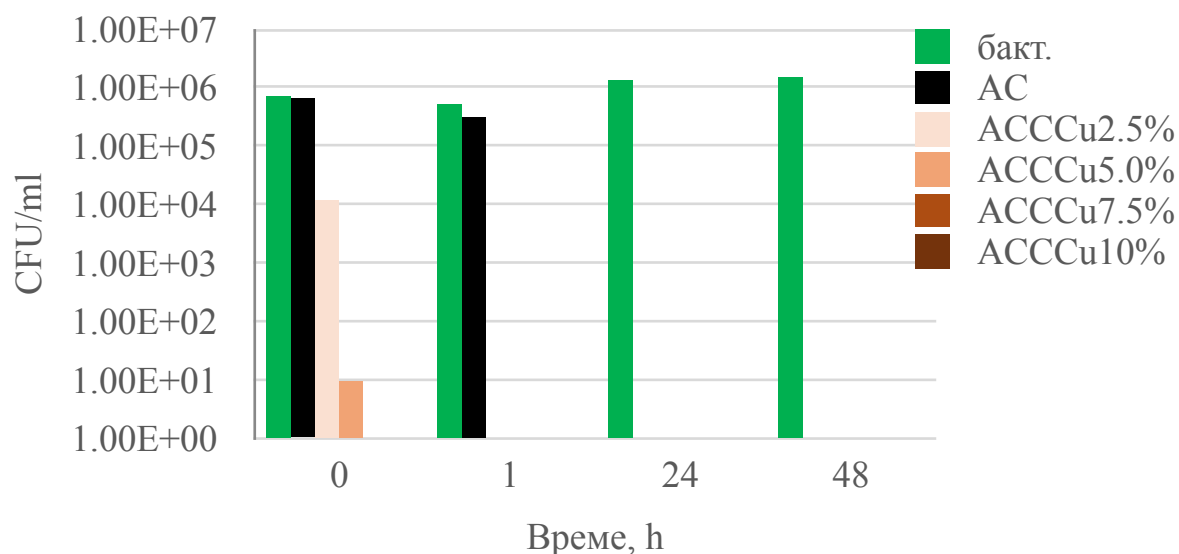
#### **4.5.2. Въздействие на въглеродни композити получени чрез хидропиролиз върху суспензии от *E. coli* референтни щамове**

За определяне на метода, с който да продължим проучването на антибактериалната активност на получените въглеродни композити избрахме следните основни критерии: най-голяма антимикробна активност на композитите, която включва намаление на микробното число и времето за въздействие; най-оптимален метод за получаване на композитите, който е определен въз основа на времеемкост, трудоемкост, енергоемкост, цена на суровините; и качество на получените композити: специфична повърхност, еднородност на порите, разпределение на наночастиците в матрицата. На така поставените изисквания, на база на проведените дотук анализи най-добре отговаря хидропиролизът, поради което в последващите експерименти се изпълват композити, получени по този метод.

За да оценим въздействието на концентрацията на метал върху антибактериалния ефект, ние продължихме с по-нататъшно тестване на материала, който показва най-добър резултат, а именно АССCu. Времето за вземане на проби, контролите и бактериалната суспензия бяха същите като в предишния обсъден анализ с изключение на АСС, съдържащ 2.5%, 5%, 7.5% и 10% мед, които бяха добавени към разтвора.

Фигура 30 представя бактериалното оцеляване на *E. coli* (CFU/ml) като функция на контактното време и концентрацията на метала. Колкото

по-дълго е контактното време и колкото по-високо е съдържанието на мед, толкова по-ниско микробно число се получава.



**Фиг. 30** Антибактериален ефект на АСС Cu при различни концентрации на медта срещу *E. coli*.

Таблица 3 дава информация за намалението (% R) на *E. coli* по отношение на концентрацията на метал при различно време на контакт. Най-добрият антибактериален ефект срещу *E. coli* със 100% намаление на микробното число се наблюдава в началната точка, когато концентрацията на метал на Cu в АСС е 7.5% и повече. АСС с по-ниски концентрацията на Cu показва същия ефект след 1 час.

**Таблица 3** Процентно намаление (% R) на *E. coli* при различна концентрация на Cu и при различно време на контакт.

Проба	%R (t=0h)	%R (t=1h)	%R (t=24h)	%R (t=48h)
<b>АС</b>	5,7	40	100	100
<b>АС+Cu (2.5%)</b>	98,3	100	100	100
<b>АС+Cu (5,0%)</b>	99,9	100	100	100
<b>АС+Cu (7.5%)</b>	100	100	100	100

Проба	%R (t=0h)	%R (t=1h)	%R (t=24h)	%R (t=48h)
AC+Cu (10%)	100	100	100	100

#### 4.5.3. Изпитване на въздействието на въглеродни композити, получени чрез хидропиролиз върху *S. aureus* (клиничен щам)

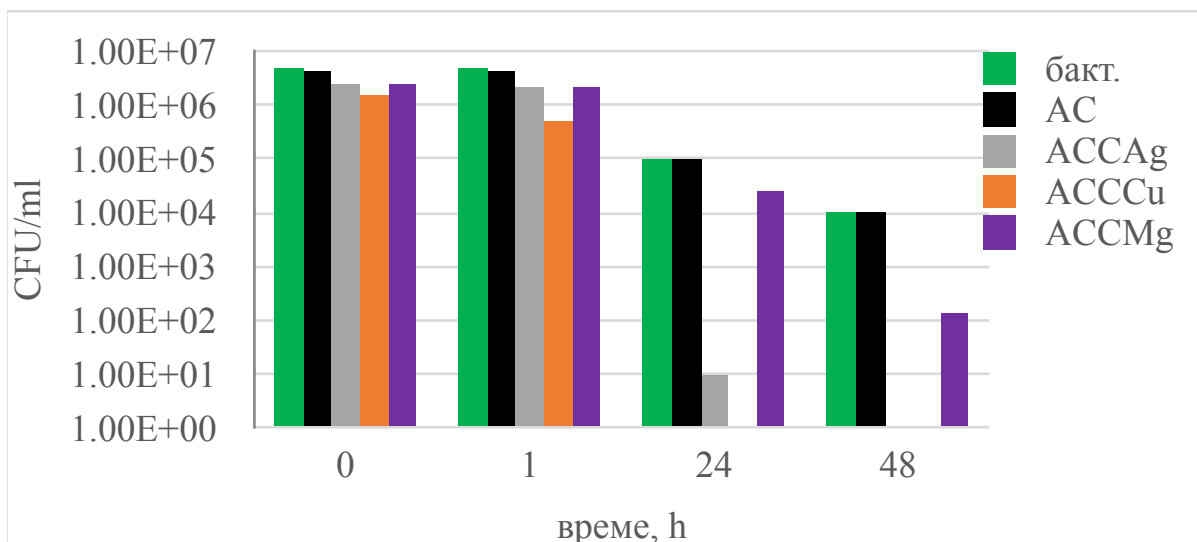
Разликата в структурата на клетъчната стена на Грам-положителните и Грам-отрицателните бактерии определя и редица разлики по отношение на устойчивостта им към антибактериални средства. Дотук беше разгледано въздействието на метал-въглеродните композити върху модел на Грам-отрицателни бактерии. За да оценим влиянието и върху Грам-положителните бактерии, новосинтезираните композити, включващи Ag, Cu и Mg бяха тествани срещу клиничен щам *S. aureus*, тъй като този вид причинява широк спектър от инфекции във всички части на човешкото тяло, но също така може безсимптомно да колонизира кожата и назофаринкса (Rigaill et al., 2023).

Гърленият секрет на пациента беше обработен съгласно добрата лабораторна практика. Изолираният щам *S. aureus* беше тестван за чувствителност към антибиотици (Vecton Dickinson, BD BBL™) и антибиограмата показва следните резултати: клиндамицин (S), ципрофлоксацин (I), еритромицин (S), цефокситин (S), гентамицин (S), пеницилин (S), сулфаметоксазол/триметоприм (S) и ванкомицин (S).

Експериментите бяха проведени при същите времена на експозиция - 0, 1, 24 и 48 часа и същите концентрации на металите в композитите 10 %. Отново като контроли бяха използвани суспензии, съдържащи само бактериалния щам и бактериален разтвор с активен въглен, за да се гарантира, че антимикробният ефект се дължи изключително на композитите.

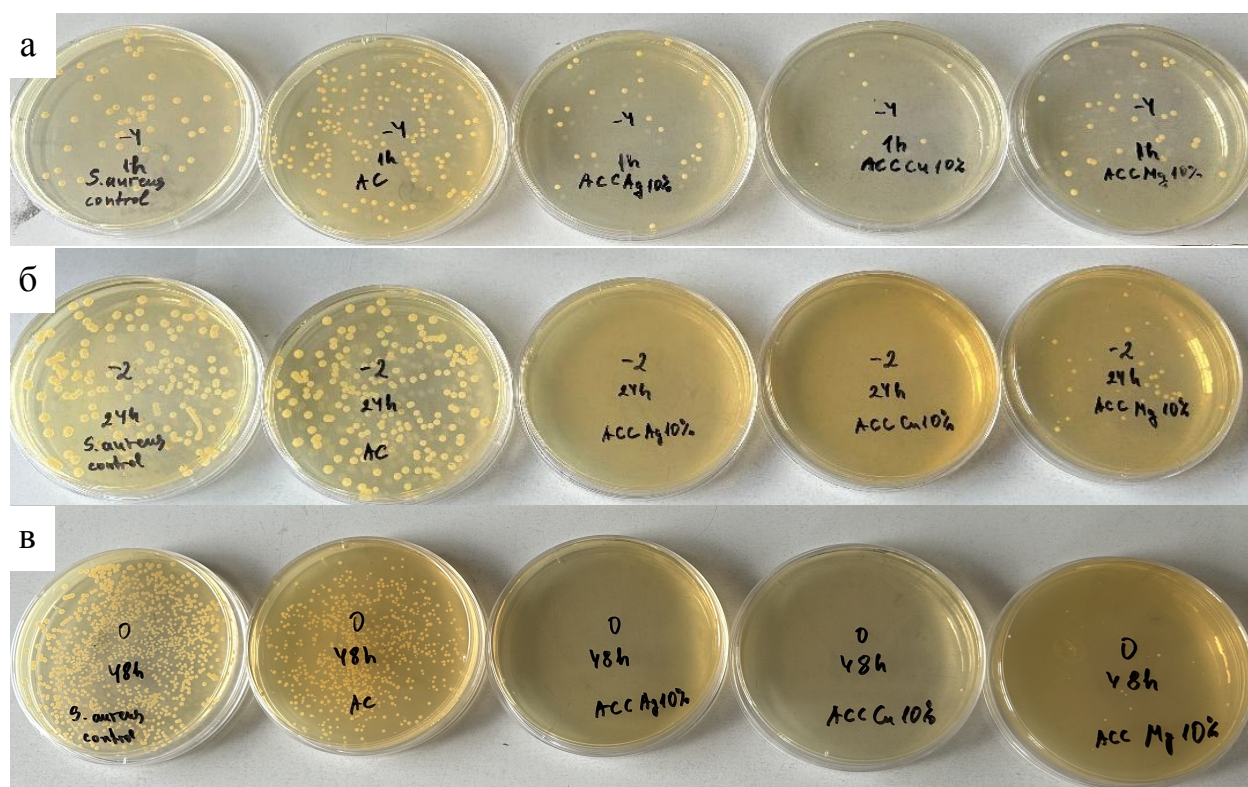
Резултатите от извършените опити са изобразени на фигура 31, която е хистограма, представяща бактериалната концентрация на *S. aureus* (CFU/ml) като функция от времето на контакт (0, 1, 24 и 48 часа) с композити, синтезирани чрез хидропиролиз. Микробният брой на първата и втората контрола леко спадна от  $10^6$  на  $10^4$  CFU/ml, т.е. със скорост от един логаритъм на ден, което показва, че бактериите изглежда са по-уязвими към експерименталните условия /условията по време на периода на тестване не осигуряват оптимален растеж / и няма взаимодействие между тях и активния въглен. Както е описано по-горе в предишния раздел, като мярка за антибактериалния ефект на металните композити беше приложен метод за определяне на микробно число.





**Фиг. 31** Антибактериален ефект на ACCAg, ACCCu и ACCMg, получени чрез хидропиролиз срещу клиничен щам *S. aureus*.

Това може да се види на фиг. 32, която е снимка на избрани посяти петрита след 24 часа инкубация, когато бактериалните колонии са видими.



**Фиг. 32** Микробно число на *S. aureus* при бактериална контрола, контрола с AC и проби с ACCAg, ACCCu и ACCMg при 1 час и 10000 x а разреждане (а), 24 час и 100 x разреждане (б) и 48 час, без разреждане (в).

Всяка бактериална колония се брои за една бактериална клетка. Липсата на колонии върху петрита за пробите с АССАg и АСССu съответства на техния отличен антибактериален потенциал.

Процентното намаление (% R) на *S.aureus* при различно време на контакт се определя както за *E. coli* по отношение на бактериалната контрола при контактено време  $T_x$ , съответно и данните са показани в таблица 4. Най-добър антибактериален ефект срещу *S.aureus* е наблюдавано при използване на 10% АССАg и АСССu със 100% намаление на микробното число за 24 часа, което е по-бавно в сравнение с *E. coli*.

**Таблица 4** Процентно намаление (% R) на *S.aureus* при различен метал (Ag, Cu и Mg) и при различно време на контакт.

Проба	%R (t=0h)	%R (t=1h)	%R (t=24h)	%R (t=48h)
АС	10	10	0	0
АССАg	52	56	99.99	100
АСССu	88	90	100	100
АССMg	52	56	76	98.6

Друго проучване (Li et al., 2006), което оценява минималните инхибиторни концентрации на наночастици, състоящи се от смес от сребърен нитрат и титанов диоксид срещу *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, също установи, че *S. aureus* е по-толерантни към наночастиците. Същото се наблюдава и в друго проучване (Joshi, 2022.). АССMg (Tahir, 2023.) също достига 98,6 % намаление, но след 48 часа.

По-високата антибактериална активност срещу *E. coli* в сравнение със *S. aureus* може да се дължи на разликата в структурата на клетъчната стена на тези бактериални видове, тъй като първият принадлежи към групата на Грам-отрицателните бактерии, а вторият към групата на Грам-положителни бактерии. Последните образуват дебел пептидогликанен слой, който е съществена бариера за много вредни химични съединения / агенти и механизми/.

Резултатите показват, че антибактериалната активност зависи от времето на контакт и естеството на метала.

Металните наночастици са добре известни със своята антибактериална активност и много изследвания потвърждават тяхната ефективност като антиминобни агенти, когато се добавят към голямо разнообразие от материали (Al-Gaashani et al., 2021). Механизмът на



антимикробната активност обаче не е напълно изяснен. Среброто е известно от древни времена със своите антимикробни свойства и антибактериален ефект на сребърните материали са получили широко внимание поради ниската токсичност на сребърните катиони към човешките клетки (Williams, 1987). Чрез използване на трансмисионна електронна микроскопия беше демонстрирано, че сребърните наночастици могат да се прикрепват и проникват в клетките на *E. coli* и освен това могат да увредят клетъчната мембрана (Choi et al., 2008). От друга страна, се съобщава, че  $Ag^+$  йони, освободени от материали на основата на среброто, взаимодействат с ензимите на дихателната верига на *E. coli* и инхибират дихателната верига, което води до клетъчна смърт (Rai et al., 2009). Marambio-Jones и Hoek, 2010 предполагат, че най-честите бактерицидни механизми на материали на основата на сребро са следните: (i) усвояване на свободни сребърни йони, последвано от прекъсване на производството на АТФ и репликация на ДНК, (ii) сребърни частици и сребърни йони в присъствието на разтворен кислород генерират реактивни кислородни съединения, които атакуват мембранните липиди и водят до разрушаване на мембранната и митохондриалната функция или причиняват увреждане на ДНК, причинявайки бактериална клетъчна смърт, и (iii) сребърните частици директно увреждат клетъчните мембрани. Производство на реактивни кислородни съединения (ROS) (Muñiz Diaz et al., 2021) и промени в клетъчните мембрани (Stoimenov et al., 2002) са вероятните бактерицидните механизми на Mg наночастици. Има много изследвания, които разкриват силен бактерициден ефект на Cu наночастици (Shaffiey et al., 2014; Motlatle et al., 2016; Babaei et al., 2018). Медните наночастици освобождават йони и ROS, които водят до липидна пероксидация и причиняват увреждане на фосфор- и сяра-съдържащи биомолекули, което води до нарушаване на вътреклетъчните биохимични процеси (Saraeva et al., 2022). Някои проучвания показват, че бактерицидните свойства на наночастиците зависят от размера, тъй като единствените наночастици, които представляват пряко взаимодействие с бактериите, за предпочитане имат диаметър  $\sim 1-10$  nm (Morones et al., 2005). Нашите резултати показват, че изследваните материали съдържат наночастици Ag, Cu и Mg в същия диапазон  $\sim 1-10$  nm и присъствие на  $Ag^0$ , мед в координации  $Cu^+$  и  $Cu^{2+}$  в съотношение 2:1,  $Mg^{2+}$ . Следователно очакваме, че те предоставят същия механизъм, както беше обсъдено по-горе.

## Изводи

1. При проведените експерименти с аеробни референтни бактериални култури, най-добър антиминобен ефект от изпитаните фотосенсибилизатори се наблюдава при използване на галиев фталоцианин.
2. Върху изпитваните анаеробни референтни бактериални култури, най-силен ефект от действието на фотосенсибилизаторите се установява при използване на метилпиридилокси цинковия фталоцианин и р-тетра-меркаптопирин цинковия фталоцианин.
3. Цинковият фталоцианин се оказва най-ефективен при третиране на референтни дрождеви култури.
4. Изпитаните клинични аеробни бактериални изолати бяха повлияни в най-висока степен при приложение на цинков фталоцианин, но въздействието, сравнено с референтните щамове е по-слабо.
5. Въздействието върху клиничните анаеробни бактериални изолати е най-явно при приложение на тетра-метилпиридилокси цинков фталоцианин, р-тетра-меркаптопирин цинков фталоцианин и окта-меркаптопирин цинковия фталоцианин, като ефектът, сравнен с този при референтните щамове е по-силен.
6. В опитите с биофилми, най-добър ефект се наблюдава при използване на силициев фталоцианин върху 48-часов биофилм на *E. faecalis*.
7. Новосинтезираните композитни материали имат много добър потенциал за приложение като антибактериални средства, особено медният композит.
8. Методът на получаване на активния въглен не влияе съществено на антибактериалните свойства. При прилагането на различните методи установихме близки стойности за въздействието им, като то е най-забележимо при едноетапния хидропирилиз.
9. Най-добър резултат при *E. coli* или 100% намаление на микробното число в първите минути се наблюдава, когато се използват композити при концентрация на мед от 7.5% и по-висока.

- 10.Получените резултати показват, че новосинтезираните композитни материали имат много добър потенциал за приложение като антибактериални средства срещу стафилококи (*S. aureus*), особено медният композит.
- 11.Физико-химичното характеризирание на композитите потвърждава съдържанието на метали и показва въглеродна матрица с много добри абсорбционни свойства и малко съдържание на примеси.
- 12.Композитите на активен въглен с метални наночастици обединяват свойствата на металите и на активния въглен, което допринася за повишаване качеството на крайния продукт и приложението на неговите антибактериални свойства, например в хигиенни устройства и индивидуални маски.

## **Приноси**

1. Приложението на фотодинамично инактивиране с метало-съдържащи фталоцианинови фотосенсибилизатори е нова оптимизирана алтернатива на използваните днес методи в борбата с бактериалните инфекции в устната кухина и тяхната профилактика.
2. Въглеродните композити се синтезират по нова екологична технология от отпадъчни продукти като прекурсори.
3. Обединяването в метало-съдържащите въглеродни композити на свойствата на металите и на активния въглен допринасят за повишаване качествата на желания продукт и разширяване приложенията на антибактериалните му свойства.
4. Получените резултати при опитите *in vitro*, могат да послужат за изготвянето на протокол за по-нататъшни опити *in vivo*.
5. Използването на фотосенсибилизатори и новосинтезирани активирани въглеродни композити е нов подход за намаляването на прекомерната употреба на антибиотици в унисон със съвременната тенденция за преодоляване на антибиотичната резистентност.
6. Разработването на нови антибактериални материали е важна стъпка в борбата срещу патогенните организми при хората и в околната среда.

## Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд

1. Angelov I, V Mantareva, V Kussovski, D Worle, H Kisov, M **Belcheva**, T Georgieva, S Dimitrov. Susceptibility of representative dental pathogens to inactivation by the PDT with water-soluble photosensitizers. LAT 2010: International Conference on Lasers, Applications, and Technologies. Edited by Panchenko, Vladislav; Mourou, Gérard; Zheltikov, Aleksei M. Proceedings of the SPIE. 2011;7994 1A:7994-45. **IF 0.440**, SJR 0.24
2. **Белчева М**, А Бончев, И Ценова, Р Василева. Влияние на фотодинамичната терапия върху *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*-причинители на инфекции в лицево-челюстната област. Обзор. Проблеми на денталната медицина. 2012;1(38):42-49.
3. **Belcheva М**, G Georgiev, B Tsyntarski, U Szeluga, L Kabaivanova. Antibacterial properties of metal nanoparticles – incorporated activated carbon composites using waste biomass as a precursor. Journal Diamonds and Related Materials. 2024;141:110545. doi.org/10.1016/j.diamond.2023.110545. **Q2 (2023) IF 4.3 (2023)**, SJR(2023) 0.67

Сумарен импакт-фактор: 4.74

## **Забелязани цитати на публикациите, свързани с дисертационния труд**

1. Angelov I, V Mantareva, V Kussovski, D Worle, H Kisov, M **Belcheva**, T Georgieva, S Dimitrov. Susceptibility of representative dental pathogens to inactivation by the PDT with water-soluble photosensitizers. LAT 2010: International Conference on Lasers, Applications, and Technologies. Edited by Panchenko, Vladislav; Mourou, Gérard; Zheltikov, Aleksei M. Proceedings of the SPIE. 2011;7994 1A:7994-45.

### **цитира се в:**

1. Elganzory H, M Arief, M Amine, El-Z Ebeid. Microwave-assisted Solvent-free Synthesis and Fluorescence Spectral Characteristics of some Monomethine Cyanine Dyes. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014; 6:143-161.

**Общ брой цитирания: 1. (SCOPUS)**



## Участия в грантови проекти и научни прояви във връзка с дисертацията

### Научни прояви

1. Angelov, Ivan; Mantareva, Vanya; Kussovski, Veselin; Worle, Diter; KisoV, Hristo; **Belcheva**, Marieta; Georgieva, Tzvetelina; Dimitrov, Slavcho. Susceptibility of representative dental pathogens to inactivation by the PDT with water-soluble photosensitizers LAT 2010: International Conference on Lasers, Applications, and Technologies. (2010).
2. М. **Белчева**, И. Ангелов, В. Мантарева, В. Късовски, Л. Кабаиванова, Б. Цинцарски. Фотодинамична инактивация на орални патогени. Трети интердисциплинарен докторантски форум 2022, юни 6-7, гр. Кюстендил, България.-доклад
3. М. **Belcheva**, G. Georgiev, V. Hubenov, I. Stoycheva, B. Tsyntarski, L. Kabaivanova. Antibacterial activity of composites based on activated carbon and Cu, Ag and Zn nanoparticles. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2022, April 23 – 26, Lisbon, Portugal.-постер
4. **Belcheva** M., G. Georgiev, V. Hubenov, B. Tsyntarski, L. Kabaivanova. M. Belcheva, G. Georgiev, V. Hubenov, B. Tsyntarski, L. Kabaivanova. Novel composites based on activated carbon and Cu, Ag, and Mg as antibacterial agents. XVth congress of Bulgarian microbiologists with international participation 2022, октомври 5-8, Копривщица, България-доклад
5. **Belcheva** M., G. Georgiev, B. Tsyntarski, L. Kabaivanova. New composites based on activated carbon and metal nanoparticles. 4th Interdisciplinary PhD forum with international participation 2023, May 16-19 Sandanski, Bulgaria.-доклад

## **Грантови проекти**

**Нов метод за третиране на патогени на устната кухина с фотодинамично активни комплекси.** Ръководител: проф. Д-р Славчо Димитров, д.м. Катедра по консервативно зъболечение, Факултет по дентална медицина, Медицински университет-София. Грант ДО 02-177/16.12.2008 на МОН.

**Иновативни метал-въглеродни композити за съхранение на водород.** Ръководител: проф. д-р Бойко Георгиев Цинцарски. Институт по органична химия с център по фитохимия, Българска академия на науките, акад. Г. Бончев., БЛ. 9 - София (България). Фонд научни изследвания; КП-06-Н27/9; 2018-2024.



## Благодарности

На първо място бих искала да благодаря на своите научни ръководители проф. д-р Людмила Кабаиванова и проф. Бойко Цинцарски за всеотдайното съдействие и отделено време при експерименталната работа, анализа и интерпретацията на резултатите и ползотворните съвети.

Изключително съм благодарна на проф. Д. Зия и на проф. А. Фридрих за оказаната подкрепа в цялостното ми професионално развитие.

За реализирането на цялостната експериментална дейност специално благодаря на колегите от:

-Факултета по дентална медицина, Медицински университет-София, България и особено на проф. С. Димитров;

-БАН, София, България и особено на проф. В. Мантарева, доц. И. Ангелов, доц. В. Късовски и Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“ в Институт по микробиология „С. Ангелов“-БАН, България;

-Катедра микробиология при Университетски медицински център Грьонинген, Холандия и особено на доц. Х. Хармсен и проф. А. ван Винкелхоф;

-Институт по клинична микробиология, Университетска клиника Мюнстер, Германия и особено на доц. З. Нииман.

Голямо БЛАГОДАРЯ на моите родители Петра и Димитър.