



Българска академия на науките
Институт по Физика на твърдото тяло
„Акад. Георги Наджаков”



Емилия Валентинова Печева

„Изучаване на биосъвместими и биологични
материали:
могат ли да бъдат повлияни от външни фактори?”

АВТОРЕФЕРАТ

За присъждане на научна степен „Доктор на науките”

професионално направление 4.1. „Физически науки“
специалност Физика на кондензираната материя

София, 2018

Данни за дисертационния труд:

Дисертацията се състои от 8 глави и заключителна част (Приноси), разположени на 217 страници, включващи 117 фигури, 12 таблици и 349 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от Общоинститутски семинар на Институт по Физика на твърдото тяло „Акад. Георги Наджаков”, БАН, състоял се на 06.02.2017г.

ISSP-BAS-2018-DSci004

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала 300 на Институт по Физика на твърдото тяло „Акад. Г. Наджаков”-БАН, бул. „Цариградско шосе” 72, пред научно жури в състав:

1. Акад. Александър Петров
2. Проф. Хассан Шамати
3. доц. д-р Виктория Виткова
4. чл.кор. Проф. Здравко Лалчев
5. Проф. Дориана Димова-Малиновска
6. Проф. Галя Станева
7. доц. д-р Николай Щърбов

Съдържание

Обща характеристика на дисертационния труд	1
Актуалност на темата	1
Цел и задачи на дисертационната работа	1
Приноси на автора	2
Публикационна активност	4
Обем и структура на дисертацията	4
Кратко изложение на дисертационния труд	6
1. Модифициране на оптична техника за по-добро визуализиране на комплексни ХА слоеве	6
2. Метод на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло	9
3. Композитни слоеве на основата на биосъвместими материали	11
3.1. ХА и извънклетъчна матрица (ИКМ) като допълнителна компонента	11
3.2. ХА и НДЧ като допълнителна компонента	12
3.3. ППХМДС полимер и НДЧ като допълнителна компонента	14
4. <i>Ин-витро</i> модели на бактериална плака и почистването ѝ	15
4.1. Създаване на <i>ин-витро</i> модели на бактериална плака с различни биофилми	15
4.2. Почистване на <i>ин-витро</i> бактериална плака със стоматологичен инструмент	16
4.3. Почистване на <i>ин-витро</i> бактериална плака с комерсиална паста за зъби, съдържаща микрогранули	18
4.4. Почистване на <i>ин-витро</i> бактериална плака с комерсиална четка за зъби с извита глава и две почистващи страни	20
Използвана литература	22
Заключения	24
Списък на публикациите, свързани с дисертацията	26
Статистически данни към февруари 2018г.	31

Обща характеристика на дисертационния труд

Актуалност на темата

Прегледът на литературата показва, че все още се работи изключително интензивно в посока на създаването на материали със свойства, близки до тези на природните материали и с приложения в сферата на човешкото здраве. Тематиката на дисертацията е пряко свързана с основни научни направления на Европейския Съюз (ЕС), както и на приетите от Българска Академия на Науките, фонд Научни изследвания и Националният Иновационен Фонд стратегически направления и приоритети включващи: «Борба със социално-значими заболявания», «Подобряване на качеството на живот», «Създаване на усъвършенствани стратегии, ориентирани към удължаване продължителността на живот на човека». Други тематични приоритети се отнасят до "Получаване на материали чрез иновационни технологии", "Моделиране и дизайн на мултифункционални материали", "Интелигентни био-материали за коригиране и възстановяване на човешката кост".

Цел и задачи на дисертационната работа

Основната цел на работата ми, описана в настоящата дисертация за научна степен „доктор на науките” бе намирането на подход(и) за модифицирането на тези два класа материали с цел селективното подобряване на техните функции и ефективен срок на използване, т.е. по такъв начин, че да покажат свойства по-близки до тези на високотехнологичните материали, създадени от Майката Природа (напр. кости, зъби).

За постигане на тази цел бяха поставени следните *задачи*:

1. Чрез въвеждане на външна енергия под формата на лазерно лъчение с контролирани параметри, да се модифицират слоеве от биосъвместимия синтетичен материал хидроксиапатит (ХА).
2. Чрез въвеждането на органика като допълнителна компонента в композитен слой на основата на ХА или биосъвместим полимер (плазмено полимеризиран хексаметилдисилоксан, ППХМДС), да се променят свойствата на ХА или ППХМДС, така че да изпълняват определена функция. Тук за модификациите бе използвана органична компонента в минимални количества, тъй като естествените материали като кости и зъби в Природата са съставени освен от неорганична и от органична компонента, за която се счита, че макар и в минимално

количество контролира зародишообразуването и израстването на неорганичната основа:

- 2.1. Използване на извънклетъчна матрица, създадена от остеобластни клетки за регулиране свойствата на ХА;
- 2.2. Използване на диамантени наночастици за промяна на свойствата на ХА;
- 2.3. Използване на диамантени наночастици за промяна на свойствата на ППХМДС;
3. Изследване на физико-химичните параметри на получените модифицирани слоеве от ХА или ППХМДС. Модифициране на съществуваща оптична техника, основаваща се на интерференция с бяла светлина за по-добро визуализиране на получените комплексни слоеве.
4. Изследване на биологичната съвместимост на получените модифицирани слоеве от ХА или ППХМДС посредством *ин-витро* експерименти с клетъчни култури.
5. Изследване на израстването и разрушаването на орални бактериални слоеве чрез създаване на *ин-витро* модели:
 - 5.1. Разрушаване на бактериалния слой чрез ефекта на кавитация, възникващ около стоматологичните инструменти за почистване на зъбна плака като се избягва механичен контакт с повърхността на зъба;
 - 5.2. Разрушаване на бактериалния слой чрез използването на комерсиална паста за зъби, съдържаща микрогранули;
 - 5.3. Разрушаване на бактериалния слой чрез използването на комерсиална четка за зъби с извита глава и две почистващи страни (предна с найлонови влакна и задна с къси и меки гумени влакна).
 - 5.4. Количествено определяне на почистващият ефект на трите средства (стоматологичен инструмент, четка и паста).

Приноси на автора

1. Беше разработен нов, контролируем, прецизен и времещащ метод за създаване на ХА, организиран на микро- и нанониво, подобно на естественото израстване на минералите в Природата. В сравнение с биоподобният метод на израстване на минералът ХА, методът на взаимодействие на лазер-течност-твърдо тяло (LLSI) довежда до синергично израстване на ХА слоеве, благодарение на ускорено зародишообразуване, провокирано от взаимодействието на лазерното лъчение с преситения разтвор на ХА прекурсори, в присъствието на твърда подложка.

2. Съществуваща СРМ система за наблюдаване на повърхности и слоеве, базираща се на интерферометрия с бяла светлина, беше модифицирана и подобрена чрез използване на математични алгоритми за обработка и създаване на 3D образи, осигурявайки бързо и неразрушаващо визуализиране на комплексни ХА слоеве (грапави, с голяма дебелина, с вътрешни кухини, прозрачност и др.). Модифицираната техника дава информация за слоевете, която допълва и надгражда получените образи от стандартни техники като оптична микроскопия, сканираща или трансмисионна електронна микроскопия, атомно-силова микроскопия, стилус и др.

3. За първи път морфологията на ХА и структурата му в далечен порядък бяха модифицирани целенасочено чрез предварителното покриване на ХА слой с безколагенна извънклетъчна матрица, създадена от остеобластни клетки. Това доведе до „насочено” минерално зародишообразуване, понижена активационна енергия и „моделирано” кристалообразуване, също както се наблюдава *ин-виво* в Природата, водейки до селективно подобряване на физическите свойства на ХА слой.

4. За първи път диамантени наночастици в минимално количество бяха използвани за вграждане в ХА покрития и по този начин модифициране на механичните им свойства (подобри пластичност и твърдост, без пукнатини и остатъчни напрежения), като „подсиленото” ХА покритие показва добра биосъвместимост с остеобластни клетки.

5. За първи път диамантени наночастици в минимално количество, чисти или модифицирани със сребро или силиций, бяха вградени в гладки ППХМДС слоеве, като варирането на типа наночастици (със сребро, силиций, чисти) и/или тяхната концентрация променя хидрофобността, биоактивността и биосъвместимостта на полимера, който има потенциално приложение в тъканното инженерство.

6. За първи път в лабораторни изследвания бяха разработени модели на зъбния канал, зъбите и меките тъкани от вътрешната страна на бузата. Върху тях бяха създадени нови *ин-витро* модели на биофилми от бактерии (*Serratia*, *S. mutans*, или двоен биофилм от *S. Sanguinis* и *S. Mutans*), които бяха използвани за разрушаване и почистване на бактериална плака, каквато се отлага върху стоматологични импланти, зъби, бузите и езика. Единият нестандартен метод, с който бе постигнато по-добро почистване беше чрез използването на ефекта на кавитация около стоматологични инструменти за почистване на зъбна плака. За по-ефективно почистване на биофилмите бяха използвани и комерсиални паста за зъби с микрогранули, както и четка за зъби с извита глава и две почистващи страни. „Почистващият” ефект по

трите метода беше определен количествено за първи път, използвайки софтуер за обработка на изображения „ImageJ”.

Публикационна активност

Резултатите от работата по дисертацията ми са публикувани в 2 глави от книга, 1 монография и 40 статии в пълен текст, от които 22 в реферирани международни списания (20 от тях са с импакт фактор) и 18 в книжки от конференции или сборници без импакт фактор. Най-висок импакт фактор на публикация с мое участие като първи автор: 4.187, Langmuir. Взела съм участие с 15 устни и 71 постерни доклада в 61 международни конференции и други мероприятия предимно в чужбина.

Обем и структура на дисертацията

Дисертационният труд е представен на 217 страници, с подробно описание на свършената работа и получените резултати. Работата съдържа 117 фигури и 12 таблици, като са цитирани 349 литературни източника.

Дисертационният труд се състои от увод, обща част с обзорец характер, специална част, съдържаща експерименталните резултати, заключения, приноси на кандидата, списък на публикации и доклади на научни конференции, включени в дисертацията. Към всяка глава има списък с цитирана литература по темата на дисертацията.

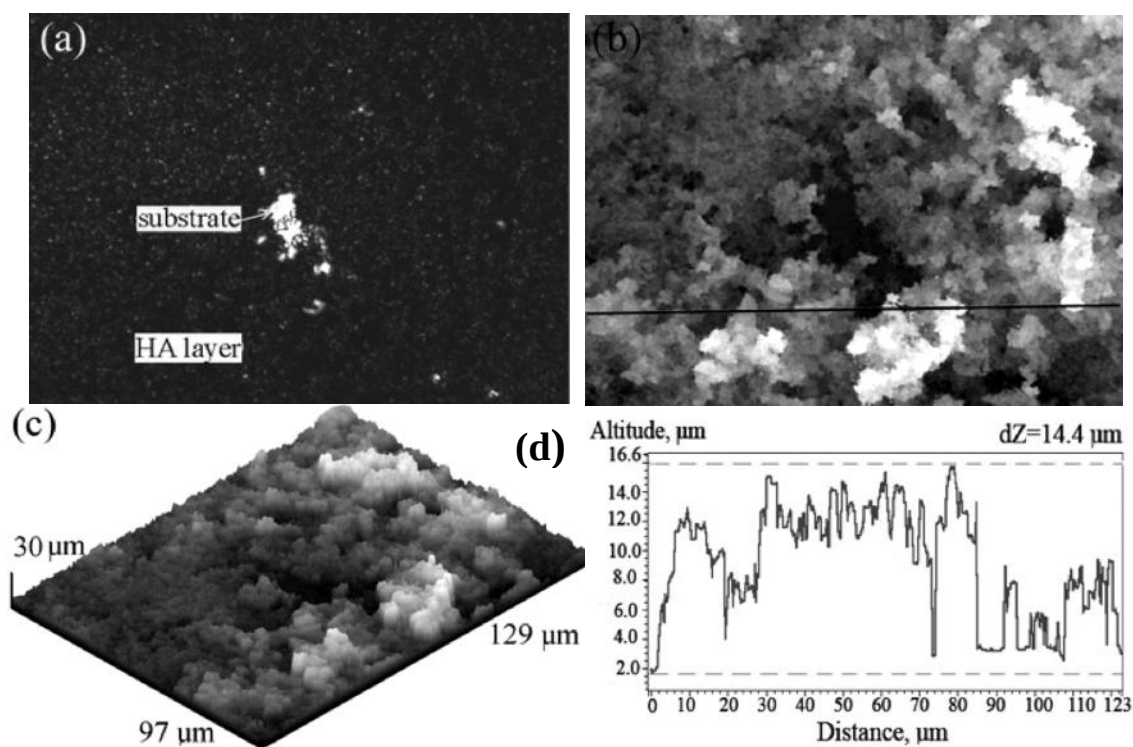
Глава 1 въвежда в темата на биосъвместимите и биологични материали, използвани по отделно или в композити; описани са и фактори, които могат да бъдат използвани за въздействие върху свойствата на тези материали. В глава 2 е направен преглед на стандартни техники, използвани за анализ на материалите, описани в дисертацията, както и се описва модификацията на оптична техника, основаваща се на интерферометрия с бяла светлина, използвана за по-добро изобразяване на израстнатите комплексните хидроксиапатитни (ХА) слоеве и допълване на информацията, получена със стандартни техники. В глава 3 подробно е описан методът на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло и механизмите отговорни за него. Глава 4 представя композитни слоеве, получени на основата на матрица от ХА или плазмено полимеризиран хексаметилдисилоксан (ППХМДС). Като допълнителна компонента в двата композита са използвани нанодиамаментни частици (НДЧ). Извънклетъчна матрица, произведена от живи клетки (остеобластни) също е използвана като органична компонента в ХА матрица. Глава 5 описва създаването на *in-vitro* модели за израстване на биофилми

(бактериална плака) върху физични модели на зъбите или бузите/езика, използвайки различни орални или неорални бактерии. Глава 6 дава информация за разрушаването на бактериалната плака чрез ефекта на кавитация, възникващ около стоматологични инструменти за почистване на зъбна плака. Глава 7 показва разрушаването на бактериална плака, използвайки комерсиални паста за зъби с микрогранули или четка за зъби с извита глава и две почистващи страни. В глава 8 са систематизирани заключенията от проведените експерименти.

Откакто първите биоматериали и композити са били създадени в лабораториите по света, основавайки се на методи и системи, съществуващи в Природата, учените работят върху подобряване на подходите за по-добра имитация на невероятните високотехнологични естествени материали, намиращи се около нас. Тази дисертация представя моят скромнен принос към изследователската работа в тази област и отговаря на въпросът, поставен в заглавието дали биосъвместими и биологични материали може да бъдат повлияни от външни фактори. Отговорите са обобщени тук.

1. Модифициране на оптична техника за по-добро визуализиране на комплексни ХА слоеве

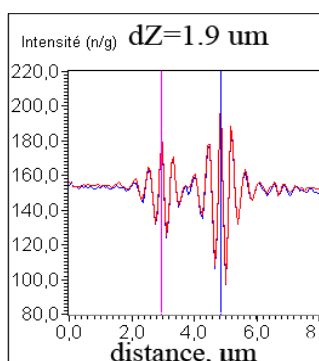
Coherence probe microscopy (CPM) е техника, използвана в моята работа за наблюдаване на ХА слоеве с голяма дебелина, грапавост, оптична прозрачност и пори вътре в слоя. CPM се базира на интерферометрия с бяла светлина и дава информация за топографията чрез няколко режима на работа, използвайки различни математични алгоритми за обработка на изображенията [1]. Наблюдавани са повърхности с размери на



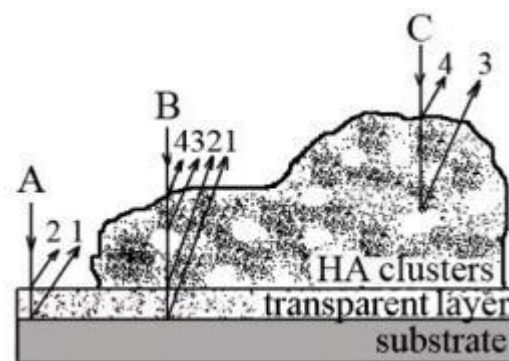
Фиг. 1. Представителни CPM образи на ХА слой: (a) режим на отражение; (b) режим grayscale; (c) 3D режим; (d) профил на повърхността съответстващ на линията в (b).

изображението 129 x 97 μm (760 x 572 pixels) със стъпка от 76 nm и вертикална чувствителност на метода 20 nm. За покриване на цялата измервана височина (прибл. 30 μm) единично измерване на слоя по дебелина изисква снемането на 260 хоризонтални двуизмерни образи, чието получаване и обработка отнема около 2 мин. Грешката при измерванията на височини е от 20 до 300 nm в зависимост от измерваната структура и от главните източници, вкарващи несигурност в системата, като напр. позиционирането на оптичната масичка с образеца, шум от камерата, математичните алгоритми и др. Данните, получени със CPM бяха сравнени със тези измерени със стандартни техники като SEM, TEM, AFM, оптичен микроскоп и стилус, за да бъде получена максимално пълна картина за топография, дебелина, грапавост, профил на ХА слоеве, размер на частици и др. На тази база беше възможно създаването и на модел на израстването на ХА слоеве.

Резултатите от CPM (Фиг. 1), подкрепени от допълнителните техники показваха значителна грапавост и хетерогенност на ХА слой, получен по биомиметичния метод [1,2]. В режим на отражение (extended depth of field, Фиг. 1a) може да се получи количествена информация за хомогенността на слоя. Режим grayscale дава представа за разпределението на ХА слой във височина (Фиг. 1b) и се получава чрез прилагане на алгоритъм на демодулация, както и филтриране със среден филтър 5 x 5. Полученият филтриран образ се използва за създаването на 3D образ (Фиг. 1c), откъдето получаваме качествена информация за ХА слой. Измереният профил по повърхността на ХА (Фиг. 1d), съответстващ на линията показана на Фиг. 1b ни дава количествена оценка за параметрите на слоя, като максимална височина (peak to valley), дебелина на слоя, размер на ХА кластери, средна



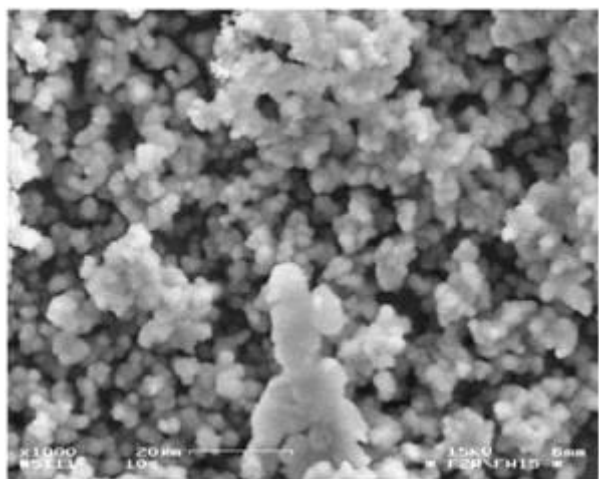
Фиг. 2. Двоен интерферентен сигнал, наблюдаван при сканиране по оптичната ос Z.



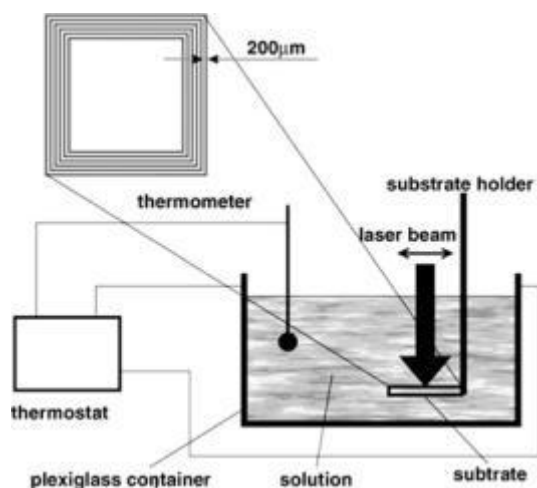
Фиг. 3. Модел на ХА слой: светлината, отразена от различните граници е отбелязана с 1 до 4.

грапавост и др. При някои образци бяха наблюдавани двойни интерференчни ивици, което ме наведе на мисълта, че съществува прозрачен слой върху подложката. Използвайки режим на сканиране по оптичната ос Z и измервайки интензитет в една точка беше получен сложен интерферентен сигнал (Фиг. 2). Разстоянието dZ между пиковите-обвивки на двата сигнала, отразени от границите подложка-слой и слой-въздух дава дебелината на този прозрачен слой: $1.9\ \mu\text{m}$. Rutherford Backscattering идентифицира слоя като окисен слой, а измерената дебелина беше $1.3\ \mu\text{m}$.

Използвайки петте описани режима на СРМ, беше съставен модел на израстването на ХА слой и бяха идентифицирани три зони по повърхността на подложката, независимо от материала ѝ (Фиг. 3): прозрачен окисен слой в зона А, тънък слой от ХА кластери ($< 10\ \mu\text{m}$) в зона В и по-дебел ХА слой (до дебелина $20\ \mu\text{m}$) в зона С. Пиковите-обвивки на интерференчните сигнали, съответстващи на отражение от различните граници са както следва: пик 1 от границата “подложка-прозрачен слой”. Пик 2 от граница “прозрачен слой-тънък ХА”, пик 3 от граница “тънък ХА –дебел ХА” и пик 4 от граница “дебел ХА-въздух”. Получените резултати бяха подобрени с промяна на съотношението сигнал-шум на оптичния сигнал чрез основни методи на обработка след получаването на образците (post processing methods), като напр. усредняване на образи, светли и тъмни корекции и други математични алгоритми [3]. Използването на хибридна High Dynamic Range (HDR) техника за комбиниране на сигнали с различно експониране подобри обхвата на техниката във височина, чрез усредняване на 20 образа (frames)



Фиг. 4. Морфология на израстнат биоподобен ХА, по метод на пресипитация от преситен воден разтвор (биоподобен подход [1,2]).

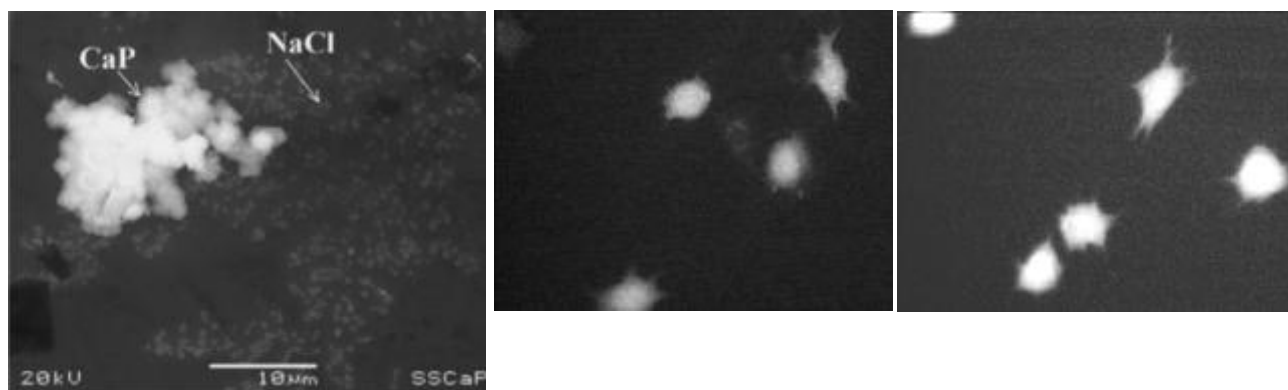


Фиг. 5. Установка, използвана при метод на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло.

за всяко експониране, “тъмна” корекция, “плоскообразна” корекция, и др. като доведе до значително подобрена детекция с оптичната система, позволявайки детекцията на суб- μm обекти с подобрен контраст.

2. Метод на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло

Традиционният метод на израстване на ХА слоеве е от преситен воден разтвор на йони, наподобяващ човешката кръвна плазма - SBF [2,4]. Морфологията на израстнат по този подход биоподобен ХА е показана на Фиг. 4: той е с голяма дебелина (20-30 μm), висока грапавост, нехомогенно разпределен по повърхността на подложката. За израстването му са нужни дни или дори седмици. Изследователите търсят начини за стимулиране на този бавен биоподобен подход. Някои от подходите включват използването на ултразвук, микровълново или УВ лъчение. В бившата лаборатория по Биосъвместими материали към ИФТТ беше разработен метод на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло, който включва взаимодействието между 3 стимула: високо енергетичен импулсен *лазерен лъч*, фокусиран върху повърхността на *твърда подложка*, потопена в хоризонтална позиция в *преситеният йонен разтвор* (Фиг. 5). Беше използван лазер с пари на меден бромид CuBr, свързан с прецизен скенер (максимална скорост 1000 mm/s) и следните параметри на лъчението: $\lambda = 578.2 \text{ nm}$, енергия в импулса 1.2 kW, изходна мощност 330 mW, плътност на мощността 50 MW/cm², продължителност на импулса 30 ns при честота на повторенията 19 kHz, диаметър на лазерният лъч във фокуса 50 μm . В резултат на лазерното облъчване, върху повърхността на различни материали (неръждаема стомана, силиций, стъкло) бяха наблюдавани калциево-фосфатни (CaP) зародиши (Фиг. 6), идентифицирани с EDX спектроскопия. При по-нататъшно държане в преситеният SBF след края на лазерното облъчване, тези зародиши доведоха до по-бързото израстване на по-дебел ХА слой, което е невъзможно по биоподобния подход. Беше направено следното теоретично обяснение на механизма на взаимодействие. Взаимодействието на високоинтензивно импулсно лазерно лъчение с материал, потопен в преситен воден разтвор (SBF) доведе до аблиране на част от повърхността на материала, съставена от окиси и замърсявания, както и изпаряване на малък обем от разтвора в близост до точката на облъчване, при което над тази точка се образува стълбче от мехурчета в разтвора, наблюдаван с невъоръжено око. Тъй като постъпват следващите лазерни импулси се изпаряват още материал и разтвор, а броят и обемът на мехурчетата нараства. В един момент на критична комбинация на Т и налягане мехурчетата се пукат. Вярваме, че в



Фиг.6. SEM образ на Фиг. 7. Култивиране на остеобластни клетки повърхността на метален върху ХА слой, израстнат върху стъкло (ляво) образец, изваден веднага и върху лазерно облъчено стъкло (дясно). след края на лазерното облъчване.

този момент в мехурчетата вероятно се получава йонизация и разбиване на компонентите на SBF, захванат в тях. В същото време, повърхността на материала е нарушена (възникнали са дефекти в местата на лазерното облъчване в следствие на аблацията) и получените CaP продукти веднага се захващат за дефектните места след спукването на мехурчетата. По нататък се образуват още зародиши чрез дифузия на йони от разтвора, намиращ се в близост до повърхността, подпомагано от вероятно увеличената локална Т.

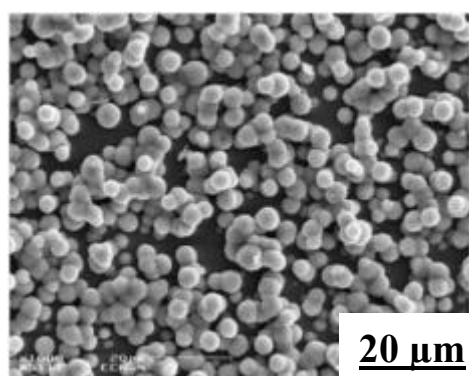
Ин-витро експерименти с остеобластни клетки разкриха добра клетъчна адхезия и разстилане върху CaP-те слоеве, израстнати след 6 часа последващо държане на лазерно-облъчени стъклени образци в SBF (Фиг. 7), както и по-голям брой на клетките, отколкото върху контролния образец без лазерно облъчване. Преживяемостта на клетките беше над 95%. Получените след методът на взаимодействие лазер-течност-твърдо тяло ХА слоеве не бяха токсични за клетките. Взаимодействието на клетките с изследваните и с контролните материали беше подобро и с покриването им с адхезивният протеин фибронектин (ФН), който естествено присъства в човешката кръвна плазма и оказва положително въздействие върху началното клетъчно взаимодействие с материалите, като индуцира и възстановява нормалната клетъчна морфология и разстилане.

Така беше разработен контролируем, прецизен и времещащ метод за създаване на ХА слоеве, организиран на микро- и нанониво, подобно на естественото израстване на минералите в Природата. Този метод е все още в началото на развитието си – оптимизирането на лазерните параметри може да подобри значително наблюдаваните процеси.

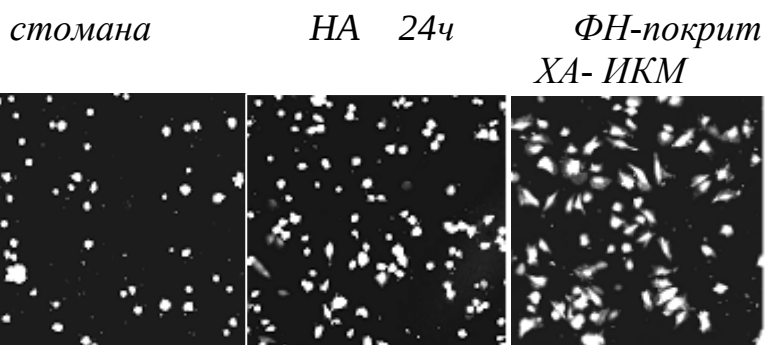
3. Композитни слоеве на основата на биосъвместими материали

3.1. ХА и извънклетъчна матрица (ИКМ) като допълнителна компонента

Контролът на биоминерализацията в Природата е рутинна дейност [5]. Организми като кости, зъби, корали, миди създават продходяща органична матрица, за която се счита, че подпомага зародишообразуването и растежа на минерала, и контролира концентрацията и степента на пресипитация на разтвора [6]. Органичните молекули са важни за началното образуване на минералните кристали, тъй като вероятно служат като център на кристализацията и влияят върху броя на създадените места за зародишообразуване, тяхното последващо израстване, ориентация и организация. ИКМ е създадена от клетките и се състои от протеини (колаген, еластин, ламинин, остеопонтин, фибронектин и др), които взаимодействат с клетъчните рецептори в клетъчните мембрани от една страна, а от друга с чуждата повърхност на материалите. Израстването на ХА върху предварително отложена ИКМ, както е направено в тук описаният експеримент, не е докладвано в литературата. ИКМ беше отложена върху стоманени образци и след това беше израстнат ХА чрез биоподобен подход за 24 ч. в SBF. Морфологията и структурното подреждане на така полученият ХА слой (Фиг. 8) се различаваше от тази на нехомогенния ХА, получен по биоподобния подход без ИКМ (виж Фиг. 4 за сравнение): израстнатият върху ИКМ ХА беше хомогенен и показва подреденост в



Фиг. 8. Морфология на ХА слой, израстнат върху ИКМ за 6 часа.



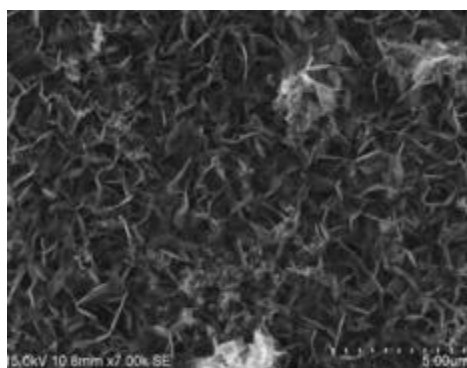
Фиг. 9. Обща клетъчна морфология на фибробластни клетки, култивирани върху стоманена подложка (ляво), ХА израстнат за 24ч. върху стомана (средата) и върху покрита с ФН ХА-ИКМ структура (дясно).

далечен порядък, с размер на ХА кластери до 5 пъти по-голям (5-6 μm) и с правилна сферична форма (сферо-подобните кластери на Фиг. 4 имат размер около 1 μm). Не се наблюдават и големите разлики във височините на биоподобния ХА слой. Експерименти с фибробластни клетки показаха, че чистият ХА (без ИКМ отдолу) не се възприема добре от клетките поради макроскопичната си грапавост, но покриването с ФН подобрява клетъчните взаимодействия с ХА (Фиг. 9).

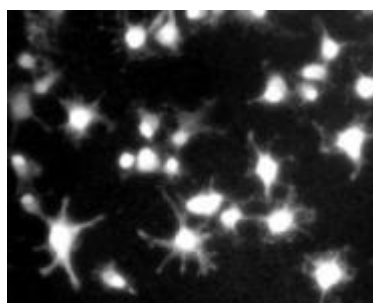
На базата на получените резултати, считам, че промяната на морфологията и структурният порядък на ХА, израстнат върху ИКМ се дължат на следното. Протеините, участващи в органичната матрица „насочват” минералното зародишообразуване, понижават активационната енергия, необходима за кристалното образуване и осигуряват места за захващане на зародишите, както и „модел” за отлагането на минерала, също както се наблюдава *ин-виво* в Природата, водейки до модифицирани физически свойства на израстнатия ХА слой.

3.2. ХА и НДЧ като допълнителна компонента

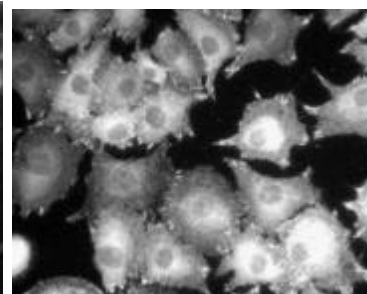
НДЧ, получени в резултат на взривяване на експлозивни и вследствие на това имащи не само малък размер (2–10 nm), но и функционална повърхност и заряд [7], са използвани като минорна компонента в ХА, отложен чрез електролиза от SBF електролит с добавени в него НДЧ [8]. Морфологията на електролитно отложеният ХА (с/без НДЧ) е различна от тази на ХА, получен по биоподобния метод: израства по-тънък, но плътен и хомогенен слой, изграден от ХА кристали с иглена форма, типична за ХА в природата (Фиг. 10). Присъствието на НДЧ се отразява на твърдостта на ХА слой: при



Фиг. 10. SEM образ на ХА-НДЧ композитен слой, получен с електролиза за 30 мин.



ХА-НДЧ



ФН-ХА-НДЧ

Фиг. 11. Морфология на остеобластни клетки, култивирани върху композитни слоеве от ХА с НДЧ (ляво) и върху същите слоеве, предварително обработени с ФН (дясно).

електролиза за 30 или 60 мин. слоевете с вградени НДЧ са по-твърди, с по-добра адхезия и кохезия (Табл. 1 и 2). Образ на отпечатъкът на диамантеното острие също показва липса на пукнатини, което говори за добра пластичност на ХА-НДЧ слой и липса на остатъчни напрежения. Общата клетъчна морфология на MG63 остеобластни клетки и фокалната адхезия разкриха

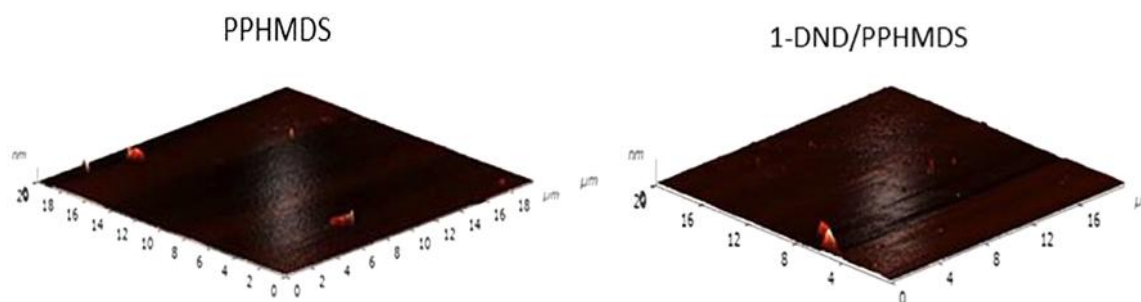
Табл. 1. Твърдост по Викерс за ХА-НДЧ покритие, получено с електролиза

Vickers hardness						
ED-AP-ND15	ED-AP-ND30	ED-AP-ND60	ED-API5	ED-AP30	ED-AP60	soaked, 24 h
310.0	394.0	453.8	335.0	355.0	373.7	333.0

Табл. 2. Кохезия (τ) и адхезия (P) на ХА-НДЧ покритие, получено с електролиза

Sample	d [nm]	τ [MPa]	P [N/m]
ED-AP60	1033 $\pm$ 76	20.3 $\pm$ 0.4	33.5 $\pm$ 0.5
ED-AP-ND60	935 $\pm$ 240	44.4 $\pm$ 11.1	51.0 $\pm$ 4.0

подобро клетъчно взаимодействие на ХА-НДЧ покритие, благодарение на предварителното покриване на слоевете с ФН (Фиг. 11). Този факт, заедно с достатъчната организация на ФН-та матрица от остеобластите са показатели за добрата биосъвместимост, която ХА-НДЧ покрития биха имали в костно обкръжение.



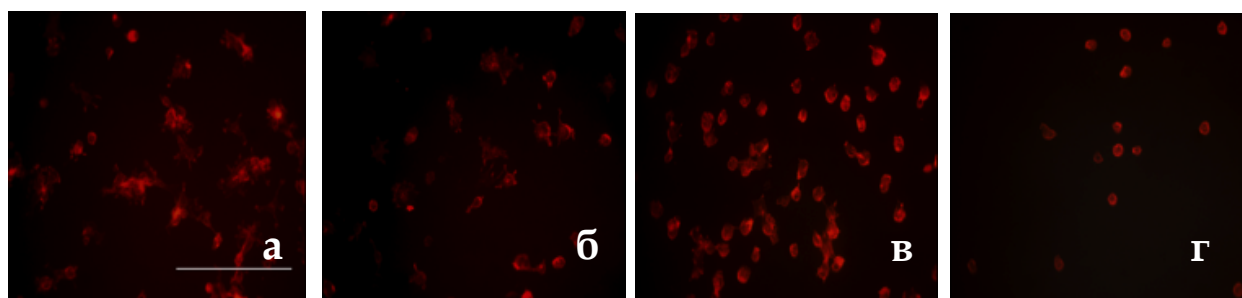
Фиг. 12. AFM образи на ППХМДС (ляво) и ППХМДС/НДЧ слоеве (дясно).

3.3. ППХМДС полимер и НДЧ като допълнителна компонента

От биологична гледна точка има смисъл да се комбинира полимер с други съединения с цел създаването на биоматериали за тъканно инженерство. Клас от синтетични полимери, каквито са органосиликатните полимери са особено подходящи поради доказаната им биосъвместимост и многобройни приложения в медицината [9].

ППХМДС тънки и гладки слоеве ($R_a = 10.4 \text{ nm}$) (Фиг. 12) бяха получени чрез плазмена полимеризация на мономера ХМДС във вакуумна камера с/без добавени НДЧ в мономера. Изходните НДЧ бяха химически модифицирани със сребро за придобиване на антимикробни свойства или със силиций за предотвратяване на агрегацията на наночастиците. Вграждането на НДЧ в полимерния слой увеличи неговата грапавост ($R_a = 15.0 \text{ nm}$ за чисти НДЧ и 50.4 nm за Ag-НДЧ), а плазмена обработка в амонячна атмосфера подобри хидрофилността на полимера (от контактен ъгъл 81° на 67°).

В литературата няма достатъчно данни как НДЧ се вграждат в полимерни матрици от органосиликатен или други полимери, нито как получените покрития взаимодействат с живи клетки. За да проверим този въпрос, бяха проведени *ин-витро* експерименти с остеобластни клетки (Фиг. 13). Най-голям брой на клетките след начална адхезия беше наблюдаван върху контролата от стъкло и върху Si-НДЧ/ППХМДС слоеве, следвани от НДЧ/ППХМДС и Ag-НДЧ/ППХМДС слоеве, като клетките имаха нетипична кръгла форма. Адхезията и формата им беше подобрена чрез предварително покриване с ФН и в този случай клетките адхезираха преференциално върху Ag-НДЧ/ППХМДС слоеве. В дългосрочен план (продължителност на клетъчна култивация 3, 5, 7 до 10 дни) клетките продължават да се развиват дори след 5-я ден, няма разлика в преживяемостта или формата им върху различно модифицираните полимерни слоеве и затова материалите изглеждат перспективни като биосъвместими покрития. От гледна точка на



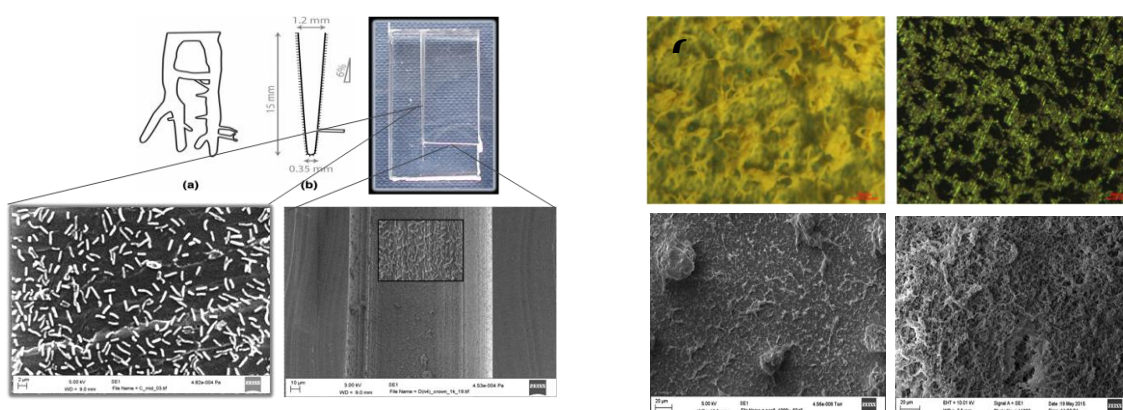
Фиг. 13. Обща морфология на MG63 остеобластни клетки, култивирани за 2 ч. върху стъкло (а), НДЧ/ППХМДС (б); Si-НДЧ/ППХМДС (в) и Ag-НДЧ/ППХМДС (г); скала $100 \mu\text{m}$.

клетъчното израстване, върху амонячно третираните полимерни слоеве клетките растат по-добре, което говори за тяхното предпочитание на по-хидрофилни материали.

4. *Ин-витро* модели на бактериална плака и почистването ѝ

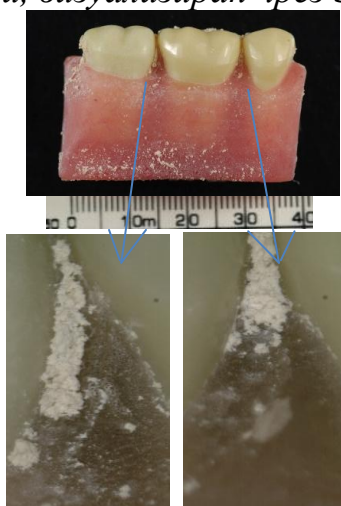
4.1. Създаване на *ин-витро* модели на бактериална плака с различни биофилми

Всяка група от микроорганизми, прикрепващи се един към друг и образуващи бактериални колонии, които се прикрепват към всякаква

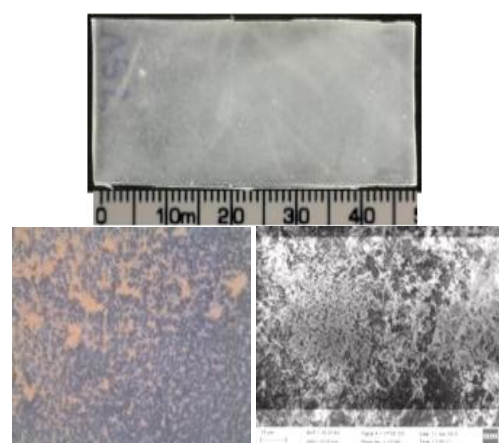


(а) Силиконов модел на каналите на зъба – представител на тяхни пространства (горе) и израстнатият биофилм в основен и страничен канали, визуализиран чрез SEM (долу).

(б) Модел на плоски повърхности на зъба: стъклени и Ti пластини (съотв. лява и дясна колона) и израстнатите биофилми (оптичен микроскоп на 1 ред, SEM на 2 ред).



(в) PMMA модел с истински зъби (горе) и с израстнат биофилм в междузъбните пространства (долу).



(г) Модел на буза/език (винилна лента) и биофилмите, визуализирани чрез оптичен микроскоп и SEM).

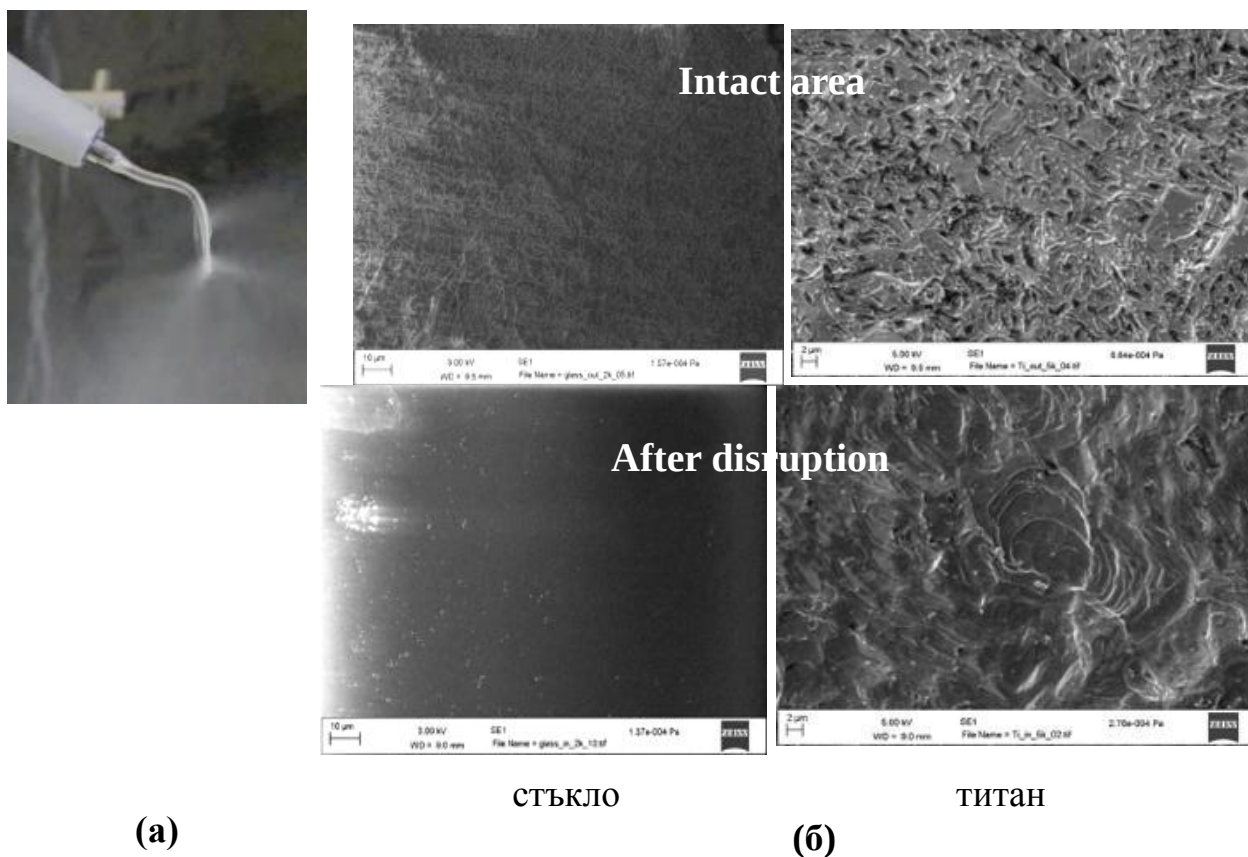
Фиг. 14. Създаване на *ин-витро* модели биофилми за изучаване израстването и почистването на бактериална плака.

повърхност, намираща се в нестерилна среда образуват биофилм (бактериален филм). Те са вградени в самопроизведена матрица от извънклетъчни полимерни субстанции (извънклетъчно ДНА, протеини и полизахариди) и участват в многобройни бактериални инфекции в човешкото тяло [10]. За изучаване образуването на биофилми и тяхното почистване от тесни места, равни или комплексни повърхности в устната кухина бяха разработени *ин-витро* модели с различни бактерии и върху различни повърхности.

Serratia NCIMB40259 е непатогенна, грам-отрицателна бактерия, образуваща биофилми върху всякаква повърхност. Участва и в *ин-ситю* образуването на минералът ХА около бактериалните клетки, прикрепящи се към дадена повърхност и така наподобява образуването на зъбен камък (зъбният камък е минерализиран биофилм) [11]. *Serratia* създава биофилми изключително лесно; също такъв лесен процес е и минерализацията им и затова представлява много удобна моделна система за изучаване почистването на плаката от тясни пространства (каналите на зъба, Фиг. 14а, или плоски повърхности като дъвкателната, предна и задна повърхност на зъбите, Фиг. 14б). *Streptococcus mutans* е орална бактерия, представител на най-разпространените бактерии в зъбната плака, които са тясно свързани с образуването на зъбен кариес [12]. Тя е използвана за почистване на модел на зъбите (Фиг. 14в). Устната лигавица е колонизирана от множество микроорганизми, като преобладават Стрептококите (*S. Sanguinis*, *S. Oralis*, *S. Salivarius* и *S. Mitis*) [13]. На базата на предишен опит, избрах смесен биофилм от *S. Sanguinis* и *S. Mutans* като моделен *ин-витро* биофилм за изследване на биофилмите, предизвикващи лошия дъх в устата (Фиг. 14г). Всички биофилми са израстнали при стерилни условия в специален биореактор, следвайки установени протоколи.

4.2. Почистване на *ин-витро* бактериална плака със стоматологичен инструмент

Денталните лекари открили, че около металният накрайник на стоматологичния инструмент, използван за почистване на зъбната плака и работещ с течаща около него водна струя, се наблюдават облаци от въздушни мехурчета [14]. Те представляват кавитационни облаци, които по подобие на кавитацията, забелязана за първи път около корабните витла биха могли да бъдат изключително разрушаващи при “контакт” с мека материя, каквато е бактериалната плака. Разрушаващият ефект се състои в следното: при постоянно осцилиращ обект, какъвто е металният накрайник на



Фиг. 15 (а) Стоматологичен инструмент, използван за почистване на зъбната плака; (б) биофилми, израстнати върху стъкло (лява колона) и титан (дясна колона) и визуализирани със SEM): преди и след разрушаване посредством ефекта на кавитация (съотв. 1 и 2 ред).

инструмента, намиращ се във водна среда, се образуват въздушни мехурчета, които в даден момент достигат критични параметри на налягане и температура и се пукат [15]. При спукването им се образува изключително силна ударна вълна, която може да разруши повърхност, намираща се в близост (мека материя или метал). Този ефект бе използван за разрушаване на зъбната плака, израстната върху модели на плоските зъбни повърхности чрез ултразвуков стоматологичен инструмент (Фиг. 15а). Целта беше да се избегне механичният контакт между инструмента и зъба, което е неприятно за някои пациенти и болезнено за други.

Ефектът на почистването на *Serratia* биофилми, израстнати върху стъкло и титан е показан на Фиг. 15. И с двете използвани оптични техники (оптичен микроскоп и SEM) се вижда, че преди въздействието на стоматологичния инструмент върху двата материала има видим биофилм. След доближаване на плаката със стоматологичния инструмент (без контакт) се наблюдава почиствена област и значително намален брой на бактериите (виждат се единични бактерии, които не образуват слой). Количествената оценка на тези образи, получена за различни комбинации “накрайник на инструмента-

Табл. 3. Ефектът на почистването на *Serratia* биофилми, израстнати върху стъкло, изразен количествено като “почистена площ” (mm²)

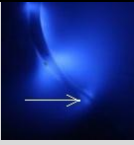
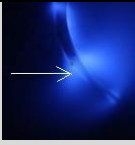
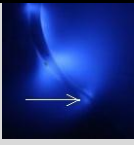
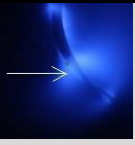
Satelec tip	 tip end	 curved side		
	40um	1mm	40um	1mm
1	4.6±2.2	3.4±0.1	4.4±1.0	-
2	4.0±0.9	1.6	6.1±3.1	-
10P	3.3±1.5	1.4±0.5	2.8±0.1	-

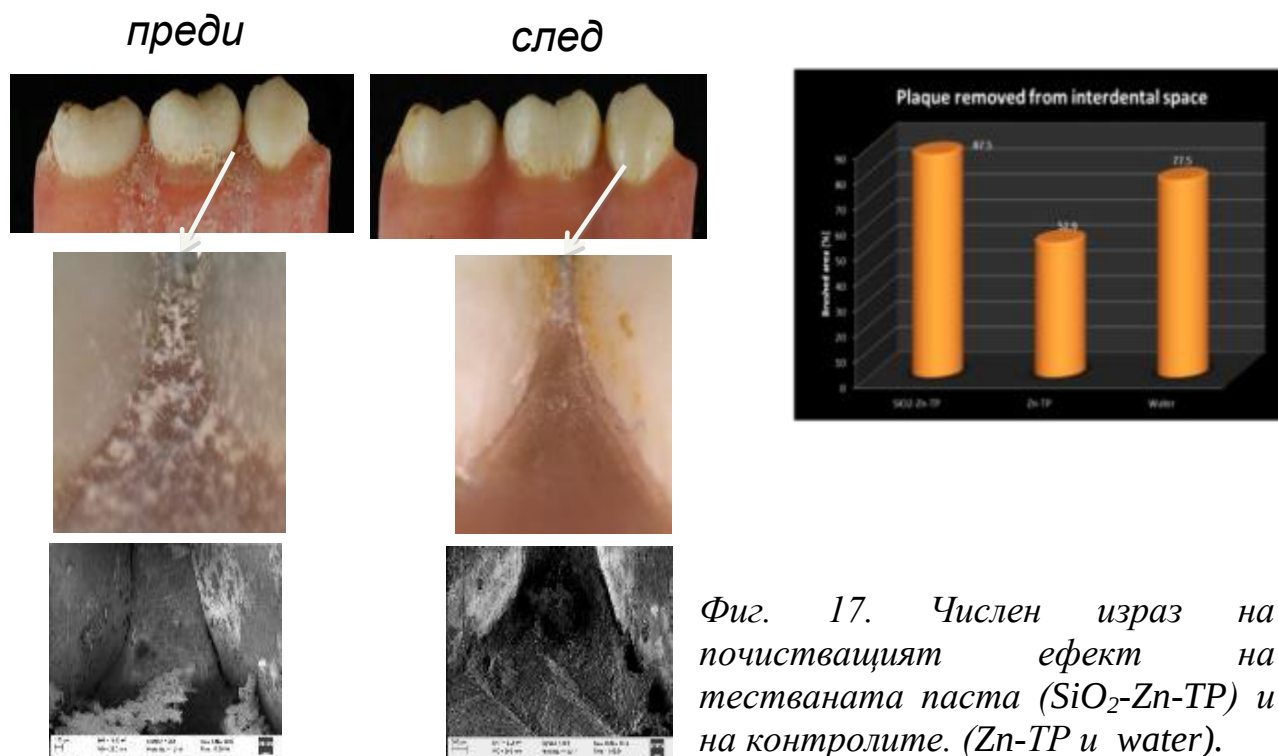
Табл. 4. Ефектът на почистването на *Serratia* биофилми, израстнати върху титан, изразен количествено като “почистена площ” (mm²)

Satelec tip	 tip end	 curved side		
	40um	1mm	40um	1mm
1	5.4±0.4	6.0±1.3	8.6±0.2	10.4±6.8
2	6.4±0.2	-	5.4±0.2	-
10P	7.8±0.2	-	10.3±1.4	-

разстояние до биофилм-осцилираща зона по дължината на накрайника” е показана в Таблицы 3 и 4. Осцилациите на накрайниците бяха предварително изучени с лазерен сканиращ виброметър, а кавитацията беше наблюдавана около свободният край на инструмента (tip end) и около изпъкналата му част (curved side). Беше използван софтуер за обработка на изображения ImageJ, както и статистически анализ с IBM statistical software (ANOVA метод). Не се наблюдава недвусмислена връзка между резултатите, получени за различните комбинации, освен, че при разстояние на металният накрайник на инструмента до биофилмите от 1 мм и почистване с кавитацията около изпъкналата част на накрайника при двата материала за трите вида накрайници не се наблюдава почистена област, т.е. кавитацията не е ефективна на това разстояние (изключение правят само титановите пластини, почиствани с накрайник №1).

4.3. Почистване на *ин-витро* бактериална плака с комерсиална паста за зъби, съдържаща микрогранули

В тези експерименти беше тествана комерсиална цинкова паста за зъби, съдържаща SiO₂ микрогранули (SiO₂-Zn-TP), а за контрола бяха използвани две групи образци: четкане с цинкова паста за зъби (Zn-TP) и четкане само с



Фиг. 17. Числен израз на почистващият ефект на тестваната паста ($\text{SiO}_2\text{-Zn-TP}$) и на контролите. (Zn-TP и water).

Фиг. 16. Модел на зъбите, преди и след почистване с тестваната паста за зъби ($\text{SiO}_2\text{-Zn-TP}$).

навлажнена четка (water). За осъществяване на контролируем и повторяем експеримент беше използван робот, към чиято ръка беше прикрепена четката. Следните параметри: количество на пастата за зъби (0.5 гр), въртеливо движение на четката с честота 0.8 Hz и натиск 2.5 N за 12 сек. бяха избрани в съответствие с препоръки на денталните лекари. Резултати от почистването с тестваната паста за зъби са представени на Фиг. 16, като ясно се вижда израстнатият биофилм върху създаденият модел на зъбите и по-специално в междузъбните му пространства преди четкането, както и почистващият ефект след четкането. На базата и на резултатите от почистване на модела с контролите, използвайки ImageJ и ANOVA статистически метод беше получена числена оценка на почистването на *in-vitro* плаката (Фиг. 17). Най-добър почистващ ефект показва тестваната паста за зъби, следвана от навлажнената четка и цинковата паста. Тъй като в литературата се среща мнение, че дори само четката играе значителна роля в почистването на плаката благодарение на механичното търкане на влакната и в зъбите, считам, че получения резултат може да се обясни по следния начин. Най-добър почистващ ефект има тестваната паста за зъби благодарение на



Фиг. 18. Изглед на тестваната четка за зъби (ляво) и контролната четка (в средата), за почистване на модел на бузите/езика и едновременно с това на зъбите. Показана е и схема на експеримента (дясно).

комбинираното механично въздействие на влакната на четката и SiO_2 микрогранулите. Без използване на тестваната паста за зъби ($\text{SiO}_2\text{-Zn-TP}$), четката, навлажнена само с вода също е ефективна, макар и в по-малка степен. И накрая, цинковата паста най-вероятно изиграва ролята на лубрикант на влакната на четката и намалява механичното им триене, което обяснява най-малката почистена площ с контролната паста за зъби.

4.4. Почистване на *ин-витро* бактериална плака с комерсиална четка за зъби с извита глава и две почистващи страни

За изследване почистването на плаката, образуваща се върху лигавицата на устната кухина (бузите и езика) беше тествана комерсиална четка за зъби с извита глава и две почистващи страни (Фиг. 18 ляво), чиято цел е да почиства едновременно зъбите и бузите/езика. За контрола беше използвана стандартна четка за зъби (Фиг. 18 средата). За осъществяване на контролируем и повторям експеримент беше използван робот, към чиято ръка беше прикрепена четката. Следните параметри: количество на пастата за зъби (0.5 гр), въртеливо движение на четката с честота 0.8 Hz и натиск 2.5 N върху зъбния модел и 1.1 N върху модела на бузата/езика, за 12 сек. Бяха избрани в съответствие с препоръки на денталните лекари. Роботизираната ръка беше придвижвана между двата модела, закрепени към фини везни за измерване на натиска върху тях, както е показано на схемата на Фиг. 18 (дясно).

Биофилмите, израстнали върху моделите на буза и зъби са показани съответно на Фиг. 19 и 20. Почистващият ефект на задната страна на четката (гумени влакна с по-голяма дължина и еластичност, отколкото на тестваната

Табл. 5. Ефектът на почистването на двоен биофилм, израстнат върху моделите на буза и зъби, изразен количествено като “почистена площ” (%)

Почистена област $\pm$ SD (%)		
	Модел буза	Модел зъби
Тествана четка	30.9 $\pm$ 12.1	89.9 $\pm$ 2.4
Контролна четка	13.9 $\pm$ 1.6	92.1 $\pm$ 2.5

контрола), но дава значителна разлика при почистването със задната страна (гумените влакна) в полза на тестваната четка, което беше и целта на този експеримент.

Използвана литература

- [1] E. Pecheva, P. Montgomery, D. Montaner, L. Pramatarova, White light scanning interferometry adapted for large area optical analysis of thick and rough hydroxyapatite layers, *Langmuir* 23 (2007) 3912-3918
- [2] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721-734.
- [3] A. Leong-Hoï, P.C. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, E. Pecheva, Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry, *Materials Today: Proceedings* 4 (1) (2017) S36-S43
- [4] L. Pramatarova, E. Pecheva, Modified Inorganic Surfaces as a Model for Hydroxyapatite Growth, in *Materials Science Foundations*, vol. 26, Trans Tech Publications, Switzerland, 2006, pp. 1-136
- [5] P. Calvert, S. Mann, Review: Synthetic and biological composites formed by in situ precipitation, *J. Mater. Sci.* 23 (1988) 3801-3806.
- [6] L. Addadi, S. Weiner, Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4110-4114.
- [7] V. Khabashesku, J. Margrave, E. Barrera, Functionalized carbon nanotubes and nanodiamonds for engineering and biomedical applications, *Diamond Relat. Mater.* 14 (2005) 859-866

- [8] K. Hristova, E. Pecheva, L. Pramatarova, G. Altankov, Improved interactions of osteoblast-like cells with apatite-nanodiamond coatings depends on fibronectin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (8) (2010) 1891–1900.
- [9] A. Colas, J. Curtis, Silicone biomaterials: history and chemistry & medical applications of silicones, in: B. Rathner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, second ed., Elsevier, Inc., New York, 2004.
- [10] L. Hall-Stoodle, J. Costerton, P. Stoodley Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nature Rev. Microbiol.* 2 (2004) 95–108
- [11] H. Medina Ledo, A. Thackray, I. Jones, P. Marquis, L. Macaskie, R. Sammons, Microstructure and composition of biosynthetically synthesised hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 3419-3427.
- [12] G. Tannok, Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body, Chapman and Hall, London, 1995, p.16
- [13] E. Theilade, Factors controlling the microflora of the healthy mouth, in: M. Hill, P. Marsh (Eds.), *Human microbial ecology*, Boca Raton, Fla, CRC Press, Inc., 1990, pp. 2–56.
- [14] C. E. Brennen, *Cavitation and bubble dynamics*, Cambridge University Press, 2013
- [15] B. Verhaagen, *Root Canal Cleaning Through Cavitation and Microstreaming*, University of Twente, thesis, 2012.

Заклучения

Следните заключения от проведената експериментална работа, описана в настоящата дисертация дават отговори на въпроса дали биосъвместими и биологични материали може да бъдат повлияни от външни фактори:

1. Зародишообразуването и израстването на биоподобен хидроксипатит (ХА) бяха ускорени чрез въвеждането на външен фактор, а именно високо интензивно импулсно лазерно лъчение. Така използвайки енергията на лазерното лъчение бе разработен Метод за създаване на структури, организирани на микро- и нанониво, който наподобява процесът на естествено израстване на материалите в Природата. Предимството на методът е, че формирането на архитектура на повърхността на материалите на микро-ниво, едновременно със зародишообразуването на калциево-фосфатни нано-частици (прекурсор на ХА) се осъществява изключително бързо, в рамките на лазерното взаимодействие с материала (< 5 мин).

2. Друг фактор, който беше използван за оказване на влияние върху *ин-витро* образуването на ХА и на биосъвместим органосиликатен полимер ППХМДС е използването на органични компоненти:

- Предварителното покриване на ХА слой с безколагенна извънклетъчна матрица, създадена от остеобластни клетки, промени морфологията на ХА и неговата структура в далечен порядък. Протеините, участващи в органичната матрица „насочваха” минералното зародишообразуване, понижавайки активационната енергия, необходима за кристалното образуване и осигуриха места за захващане на зародишите, както и „модел” за отлагането на минерала, също както се наблюдава *ин-виво* в Природата, водейки до модифицирани физически свойства на израстнатия ХА слой.
- Вграждането на диамантени наночастици в ХА покрития на метали, използвани за импланти (титан, неръждаема стомана) подобри твърдостта и пластичността на покритието, без да внася остатъчни напрежения и пукнатини. Така полученото композитно покритие беше биоактивно, тъй като в преситен воден разтвор, наподобяващ човешката кръвна плазма, доведе до надрастването на допълнителен биоподобен ХА слой с подобрена кристалност.
- Вграждането на диамантени наночастици в тънко и гладко покритие от биосъвместимия ППХМДС увеличи повърхнинната му грапавост, а

последващата плазмена обработка с амоняк намали хидрофобността на слоя, подобрявайки по този начин неговото взаимодействие с живи клетки.

3. Образуването на орални бактериални слоеве върху зъбите и меките тъкани в устата (език, вътрешната страна на бузата) бе изследвано чрез разработването на *ин-витро* бактериални модели. Беше показано, че физическият ефект на кавитация, възникващ около стоматологичните инструменти за почистване на зъбна плака може да се използва за разрушаване на плаката, като се избягва механичният контакт с повърхността на зъба, който създава дискомфорт на пациента.

4. Беше показано, че комерсиална паста за зъби, съдържаща микрогранули, както и комерсиална четка за зъби с извита глава и две почистващи страни са по-ефективни в почистването на плака от зъбите и меките тъкани в устата, отколкото обикновените пасти (без гранули) и четки за зъби (с една почистваща страна).

Последните два резултата могат да допринесат за предотвратяването на редица заболявания посредством подобряване на устната хигиена и здраве, както и до подобряване на комфорта на пациента, стоящ на зъболекарския стол.

Списък на публикациите, свързани с дисертацията
(степената „доктор” е придобита през юни 2005 г.)

Монографии и глави в книги

1. E. Pecheva, L. Pramatarova, T. Hikov, K. Hristova, G. Altankov, P. Montgomery, T. Hanawa, Electrodeposition of Hydroxyapatite-Nanodiamond Composite Coating on Metals. Interaction with Proteins and Osteoblast-like Cells, in: Electrodeposition: Properties, Processes and Applications, Udit Surya Mohanty (Ed.), Nova Publishers, USA, September 2012, Ch.11, pp. 233-253
2. L. Pramatarova, E. Radeva, E. Pecheva, T. Hikov, N. Krasteva, R. Dimitrova, D. Mitev, P. Montgomery, R. Sammons, G. Altankov, The advantages of polymer composites with detonation nanodiamond particles for medical applications, Ch. 14, pp. 297-320, in: On Biomimetics, Assoc. Prof. Dr. Lilyana Pramatarova (Ed.), InTech Publications, August 2011
3. L. Pramatarova, E. Pecheva, Modified Inorganic Surfaces as a Model for Hydroxyapatite Growth, in Materials Science Foundations, vol. 26, Trans Tech Publications, Switzerland, 2006, pp. 1-136

Статии в пълен текст в реферирани международни издания с ИФ и други източници

4. N. Vyas, E. Pecheva, H. Dehghani, R.L. Sammons, Q.X. Wang, D.M. Leppinen, A.D. Walmsley, High Speed Imaging of Cavitation around Dental Ultrasonic Scaler Tips, PLoS ONE 11(3) (2016) :e0149804 (*ИФ 4.411*)
5. E. Pecheva, R.L. Sammons, A.D. Walmsley, The performance characteristics of a piezoelectric ultrasonic dental scaler, Medical Engineering and Physics 38(2) (2016) 199-203 (*ИФ 1.619*)
6. T. Hikov, L. Pramatarova, N. Krasteva, E. Radeva, P. Petrik, E. Agocs, E. Pecheva, R. Presker, O. Sabotinov, Study of nanocomposite layers based on polymer and nanodiamond particles: new materials for medical implants, Bulgarian Journal of Physics 39 (2012) 297-308
7. K. Hristova, E. Pecheva, L. Pramatarova, G. Altankov, Improved interaction of osteoblast-like cells with apatite-nanodiamond coatings depends on fibronectin, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 22(8) (2011) 1891-1900 (*ИФ 2.316*)
8. E. Pecheva, L. Pramatarova, T. Hikov, Y. Tanaka, H. Sakamoto, H. Doi, Y. Tsutsumi, T. Hanawa, Apatite-nanodiamond composite as a functional coating of stainless steel, Surface and Interface Analysis 42 (2010) 475-480 (*ИФ 1.247*)

9. P. Montgomery, D. Montaner, L. Pramatarova, E. Pecheva, Characterisation of the internal structure and local optical properties of thick layers of hydroxyapatite by coherence probe microscopy, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(9) (2009) 1175-1181 (*IIF 0.433*)
10. E. Pecheva, L. Pramatarova, D. Fingarova, T. Hikov, I. Dineva, Z. Karagyozova, S. Stavrev, Advanced materials for metal implant coatings, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(9) (2009) 1323-1326 (*IIF 0.433*)
11. T. Hikov, L. Pramatarova, E. Radeva, L. Vanzetti, E. Iacob, R. Dimitrova, E. Pecheva, S. Stavrev, D. Fingarova, Study of plasma polymer structures to induce composite layers, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(9) (2009) 1327-1330 (*IIF 0.433*)
12. E. Radeva, L. Pramatarova, R. Dimitrova, S. Popova, T. Hikov, D. Fingarova, E. Pecheva, Infrared analysis of plasma polymerized hexamethyldisiloxane for biocompatible composites, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(10) (2009) 1432-1435 (*IIF 0.433*)
13. E. Pecheva, T. Petrov, C. Lungu, P. Montgomery, L. Pramatarova, Stimulated in vitro bone-like apatite formation by a novel laser processing technique, *Chemical Engineering Journal* 137 (2008) 144-153 (*IIF 2.813*)
14. A. Kondyurin, E. Pecheva, L. Pramatarova, Calcium phosphate formation on plasma immersion ion implanted low density polyethylene and polytetrafluorethylene surfaces, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 1145-1153 (*IIF 1.508*)
15. E. Pecheva, L. Pramatarova, G. Altankov, Hydroxyapatite grown on a native extracellular matrix: initial interactions with human fibroblasts, *Langmuir* 23 (18) (2007) 9386-9392 (*IIF 4.187*)
16. E. Pecheva, P. Montgomery, D. Montaner, L. Pramatarova, White light scanning interferometry adapted for large area optical analysis of thick and rough hydroxyapatite layers, *Langmuir* 23 (7) (2007) 3912-3918 (*IIF 4.187*)
17. L. Pramatarova, E. Pecheva, V. Krastev, F. Riesz, Ion implantation modified stainless steel as a substrate for hydroxyapatite deposition. Part I. Surface modification and characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (3) (2007) 435-440 (*IIF 1.508*)
18. L. Pramatarova, E. Pecheva, V. Krastev, Ion implantation modified stainless steel as a substrate for hydroxyapatite deposition. Part II. Biomimetic layer growth and characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (3) (2007) 441-447 (*IIF 1.508*)
19. M. Dimitrova, L. Pramatarova, E. Pecheva, P. Laquerriere, P. Montgomery, A. Petrova, G. Altankov, Osteoblast cells activity on calcium phosphate

- layers grown on glass by a laser-liquid-solid interaction, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 9 (1) (2007) 240-243 (*ИФ 0.577*)
20. F. Riesz, L.D. Pramatarova, E.V. Pecheva, M. Dimitrova, Application of Makyoh (magic-mirror) topography in the research of artificial biomineralization, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 9 (1) (2007) 201-204 (*ИФ 0.577*)
 21. L. Pramatarova, E. Pecheva, M. Dimitrova, A. Petrova, P. Montgomery, T. Petrov, Mechanical properties of extracellular matrix/hydroxyapatite composites, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 9 (1) (2007) 229-232 (*ИФ 0.577*)
 22. L. Pramatarova, E. Pecheva, S. Stavrev, T. Spasov, P. Montgomery, A. Toth, M. Dimitrova, M. Apostolova, Artificial bones through nanodiamonds, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 9 (1) (2007) 236-239 (*ИФ 0.577*)
 23. E. Pecheva, L. Pramatarova, A. Szekeres, T. Nikolova, P. Montgomery, Application of porous SiO_x layer as a template for calcium phosphate growth, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 9 (1) (2007) 233-235 (*ИФ 0.577*)
 24. L. D. Pramatarova, E. V. Pecheva, Z. A. Zanev, R. P. Presker, M. I. Dimitrova, Novel processing technology for production of hierarchically organized micro and nanometer scale surfaces, *Nanoscience and Nanotechnology*, eds. E. Balabanova, I. Dragieva, Heron Press, Sofia, vol. 6 (2006) 247-250
 25. L. Pramatarova, E. Pecheva, R. Presker, Formation of surfaces organized on both micro- and nanometer scale by a laser-liquid-solid-interaction process, *Plasma Processes and Polymers* 3 (2006) 248-252 (*ИФ 2.921*)

Статии в пълен текст в доклади на конференции и други източници

26. A. Leong-Hoï, P.C. Montgomery, B. Serio, W. Uhring, E. Pecheva, Improvement in measurements of hydroxyapatite layers by hybrid high dynamic range image processing in white-light interferometry, *Materials Today: Proceedings* 4 (1) (2017) S36-S43
27. L. Pramatarova, T. Hikov, N. Krasteva, P. Petrik, R. Dimitrova, E. Pecheva, E. Radeva, R. Presker, Protein adsorption on detonation nanodiamond/polymer composite layers, *MRS Symposium Proceedings* 1479 (2013) 51-56
28. L. Pramatarova, T. Hikov, R. Dimitrova, N. Krasteva, E. Radeva, E. Pecheva, Ph. Kern, J. Werckmann, Development and analysis of silver containing plasma polymer nanocomposites: scaffolds for tissue engineering,

Proceedings of International Conference on Material Sciences and Technology (MST2011), v. 4, pp. 620-624

29. P.C. Montgomery D. Montaner, E. Pecheva, L. Pramatarova, E. Halter, R. Barillon, J.P. Stoquert, Structural and optical characterization of thick, complex layers by polychromatic interferometry (Caractérisation structurelle et optique des couches épaisses et complexes par interférométrie polychromatique), Proceedings of the 10th Francophone conference on "Optical methods and techniques for industry", CMOI, Reims, France, 16-20 November 2009, Société Française d'Optique, 2010, ISBN 9782918241010.
30. N. Krasteva, G. Toromanov, K. Hristova, E. Radeva, E. Pecheva, R. Dimitrova, G. Altankov, L. Pramatarova, Initial biocompatibility of plasma polymerized hexamethyldisiloxane films with different wettability, Journal of Physics: Conference Series 253 (2010) 012079
31. L. Pramatarova, N. Krasteva, E. Radeva, E. Pecheva, R. Dimitrova, T. Hikov, D. Mitev, K. Hristova, G. Altankov, Study of detonation nanodiamond-plasma polymerized hexamethyldisiloxane composites for medical application, Journal of Physics: Conference Series 253 (2010) 012078
32. P. Montgomery, F. Anstötz, J. Montagna, D. Montaner, L. Pramatarova, E. Pecheva, Towards real time 3D quantitative characterisation of in situ layer growth using white light interference microscopy, Journal of Physics: Conference Series 253 (2010) 012017
33. E. Radeva, L. Pramatarova, E. Pecheva, T. Hikov, E. Iacob, L. Vanzetti, R. Dimitrova, N. Krasteva, T. Spassov, D. Fingarova, Study of Organosilicon Plasma Polymer Used in Composite Layers with Biomedical Application, Proceedings of AIP 10(1) (2010) 949-954
34. L. Pramatarova, E. Pecheva, R. Dimitrova, T. Spassov, N. Krasteva, T. Hikov, D. Fingarova, D. Mitev, Hydroxyapatite Reinforced Coatings with Incorporated Detonationally Generated Nanodiamonds, Proceedings of AIP 10(1) (2010) 937-942
35. N. Krasteva, K. Hristova, E. Radeva, E. Pecheva, R. Dimitrova, L. Pramatarova, Effect of Ammonia Plasma Treatment on the Biological Performance of Plasma Polymerized Hexamethyldisiloxane, Proceedings of AIP 10(1) (2010) 688-693
36. E. Pecheva, L. Pramatarova, A. Toth, T. Hikov, D. Fingarova, S. Stavrev, E. Iacob, L. Vanzetti, Effect of Nanodiamond Particles Incorporation in Hydroxyapatite Coatings, ECS Transactions 25(3) (2009) 403-410, "Analytical Techniques for Semiconductor Materials and Process Characterization 6 (ALTECH 2009)", B. Kolbesen, C. Claeys, L. Fabry, M.

- Bersani, D. Giubertoni, G. Pepponi (eds.), 216th ECS Meeting, 4-9 October 2009, Vienna, Austria
37. E. Pecheva, L. Pramatarova, Z. Karagyozeva, S. Stavrev, Advanced materials for metal implant coatings, Proceedings of the XX Congress of Chemists and Technologists of Macedonia and V Congress of the Metallurgists of Macedonia, 17-20 September 2008, Ohrid, Macedonia
 38. L. Pramatarova, M. Dimitrova, P.C. Montgomery, E. Pecheva, S. Stavrev, M. Apostolova, N. Milinovic, A. Toth, T. Petrov, A. Petrova, Detonation generated nanodiamond reinforced calcium phosphate composites grown through laser-liquid-solid-interaction process, Proceedings of the IX International Conference "Laser and Laser-Information Technologies: Fundamental Problems and Applications" (ILLA/LTL) (2007) 245-253
 39. L. Pramatarova, R. Dimitrova, E. Pecheva, T. Spasov, M. Dimitrova, Peculiarities of hydroxyapatite/nanodiamond composites as novel implants, Journal of Physics: Conference Series 93 (2007) 012049
 40. E. Pecheva, P. Montgomery, Adaptation of Coherence Probe Microscopy (CPM) for the analysis of rough layers of hydroxyapatite deposited on various substrates, technical report "Rhenaphotonics", June 2006, InESS archives
 41. L. Pramatarova, E. Pecheva, Bioactivity of nanostructured surfaces, in Functional Properties of Nanostructured Materials, Eds. R. Kassing, P. Petkov, W. Kulisch, C. Popov, Springer-Verlag, Berlin, 2006, NATO Science Series, Mathematics, Physics and Chemistry, vol. 223, p. 505-510
 42. E. Pecheva, P. Montgomery, D. Montaner, L. Pramatarova, Z. Zanev, Optimised 3D surface measurement of hydroxyapatite layers using adapted white light scanning interferometry, Proceedings of SPIE 6341 (2006) 634137
 43. L. D. Pramatarova, E. V. Pecheva, C. P. Lungu, O. N. Sabotinov, Development of optical diagnostic of laser plasma for in situ monitoring of laser irradiation during the hydroxyapatite deposition, Proceedings of the LTL International Symposium, 8-11 October 2005, Plovdiv, Bulgaria, pp. 328-333 (2006)

Статистически данни към февруари 2018г.

Публикации в международни списания с IF	22
Публикации в международни сборници	20
Книги и глави в книги (на английски)	2 глави, 1 монография
Цитати и h-индекс	> 200 ; h-индекс 11
Най-висок IF на списание с публикация на Е. Печева	4.558 (Europ. Cells & Mat.) 4.187 (Langmuir)
Ко-ръководител на аспиранти и дипломанти в чужбина	2 аспиранти, 2 дипломанти
Участие в международни конференции	61 (15 устни и 71 постерни доклада)
Ръководител на международни проекти	5 (индустрия, NATO, JSPS)
Участие в международни проекти	9
Участие в национални проекти	4
Награди: Най-добър млад учен (< 35 г.), БАН , декември 2008 и Най-добър най-млад учен (< 30 г.), БАН , май 2004; 2 място за най-добра дисертация по физика за 2005г., декември 2005; 1 място за постерна презентация на международна конференция ECM V: The Cell Biomaterial Reaction, Davos, Switzerland, юни 2004	