



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по физика на твърдото тяло
Академик Георги Наджаков



Лаборатория Акустоелектроника

Карекин Дикран Есмерян

**НЕОМОКРЯЕМИ ВЪГЛЕРОДНИ САЖДИ ОТ РАПИЧНО ОЛИО –
МУЛТИФУНКЦИОНАЛЕН НАНОМАТЕРИАЛ В ПОМОЩ НА
ОБЩЕСТВОТО**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на научната степен „**доктор на науките**”

Научна област: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.1. Физически науки

Специалност: Физика на кондензираната материя

РЕЦЕНЗЕНТИ:

1. проф. дфн. Мирослав Вергилов Абрашев
2. проф. дфн. Албена Паскалева Дончева
3. проф. д-р Албена Георгиева Йорданова

София, 2024 г.

Дисертацията се състои от 234 страници, 34 таблици, 22 формули и уравнения, и 433 цитирани литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита от **Общоинститутския семинар на Института по физика на твърдото тяло (ИФТТ-БАН)**, проведен на 02.10.2024г.

ISSP-BAS-2024-DSci-006

Дисертантът работи като доцент в лаборатория Акустоелектроника към ИФТТ-БАН, град София.

Изследванията са извършени в ИФТТ-БАН, както и в следните национални и чуждестранни научноизследователски институции и медицински центрове:

- МБАЛ „Надежда“, България
- Медицински център „Репробиомед“, България
- Частно лечебно заведение за доболнична помощ „Неоклиник“, България
- СБАЛГАР „Д-р Малинов“, България
- Virginia Commonwealth University, САЩ

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 09.12.2024г. от 11 часа в зала 300 на Института по физика на твърдото тяло пред научно жури в състав:

Външни членове:

проф. дфн. Мирослав Вергилов Абрашев – ФзФ-СУ „Св. Климент Охридски“

проф. дфн. Стоян Христов Русев – ФзФ-СУ „Св. Климент Охридски“

проф. д-р Албена Георгиева Йорданова – МФ-СУ „Св. Климент Охридски“

доц. д-р Гергана Емилова Алексиева – ФзФ-СУ „Св. Климент Охридски“

Вътрешни членове:

проф. дфн. Албена Паскалева Дончева – ИФТТ-БАН

проф. дфн. Йордан Георгиев Маринов – ИФТТ-БАН

проф. д-р Димитър Захариев Димитров – ИФТТ-БАН

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Личен състав“ на ИФТТ-БАН.

Автор: Карекин Дикран Есмерян

Заглавие: НЕОМОКРЯЕМИ ВЪГЛЕРОДНИ САЖДИ ОТ РАПИЧНО ОЛИО – МУЛТИФУНКЦИОНАЛЕН НАНОМАТЕРИАЛ В ПОМОЩ НА ОБЩЕСТВОТО

Увод – актуалност на темата

Съвременният технологичен напредък на човечеството е белязан от няколко запомнящи се индустриални революции, обхващащи преминаването от ръчно производство към по-автоматизирана обработка чрез машини работещи с пара и вода, последвани от появата на телеграфите, железопътните мрежи, доставките на газ/вода и канализационните системи и завършващи с изобретяването на интернет и домашните компютри, заедно с възхода на нанотехнологиите.

В наши дни нанотехнологиите се считат за един от шедъворите на науката, тъй като способността да се манипулира материята на атомно ниво отваря буквално безкрайни възможности за проектиране на нови функционални структури, материали и устройства. Следователно много сектори на промишлеността като строителство, корабостроене, авиация, гражданско инженерство, хладилна и енергийна техника и т.н. могат да се възползват по различни начини от новите концепции и прозрения в нанонауките, което води до потенциал за разработване на продукти с висока добавена стойност. Примерите за такива продукти включват, но не се ограничават до, производство на прозорци за жилищни и бизнес сгради оставащи напълно сухи и чисти след валеж (известни също като „самопочистващи се повърхности“), вечно стерилно медицинско оборудване изложено на неконтролирана околна среда, антикорозионни метални компоненти, високоефективни первапоративни мембрани, въздухоплавателни средства и системи за възобновяема енергия пасивно защитени (без нужда от външен източник на енергия) от атмосферно/кондензационно обледеняване, усъвършенствани и преносими химически и биологични сензори или „умни“ петролни скимери.

Гореспоменатите научни иновации се основават на прецизна физическа и химическа модификация на конкретната твърда повърхност, превръщайки я в свръхнеомокряема (срещаща се в литературата и като свръххидрофобна, ако участващата течност е вода). Обикновено това се случва чрез отлагане на тънък неомокряем филм, притежаващ необходимата хидрофобна химия, върху твърда повърхност със специфична топография и йерархична грапавост (напр. съставена от неравности с микронни и наноразмери). За да изпълни строгите критерии за комерсиализация, обаче, всяко неомокряемо покритие трябва да балансира между мащабируемост (подходящо за широкомащабно производство), приложимост към обекти със сложна геометрия и кривина, ниска цена, дългосрочна механична якост и не на последно място, мултифункционалност (ако е

възможно, покритието трябва да проявява едновременно антикорозионни, ледофобни и антимикробни свойства).

Подобна комбинация е трудно постижима и един от редките примери за покрития отговарящи на изискванията, изненадващо, принадлежи на тези изработени от въглеродни сажди. Въпреки това, общоприето е, че саждите са силно токсично вещество, чието натрупване в тропосферата е основната причина за тревожните климатични промени. Затова усилията в световен мащаб са насочени към декарбонизация на промишлеността и подмяна на двигателите с вътрешно горене. Следователно, стремежите за превръщане на отпадъците от сажди във функционални неомокряеми продукти звучат до известна степен налудничаво, но ще бъдат доказани тук и ще предоставят основа за преосмисляне на текущия дневен ред.

Настоящата докторска дисертация обобщава новите знания натрупани през последните петнадесет години от изследвания посветени на експерименталното определяне, проектиране, охарактеризиране и оптимизиране на различни свръххидрофобни покрития от сажди, получени от изгаряне на рапично олио. Тези моделни сажди могат да потиснат образуването на лед и бактериални отлагания върху различни твърди повърхности, да облекчат двуфакторното увреждане от замръзване по време на криоконсервация на човешки сперматозоиди, да активират тяхната подвижност и могат да служат като сензорен наноматериал, който е от полза за количествен анализ на човешка семенна течност и урина, както и за проследяване на режимите на замръзване на водни капки.

Цел и задачи на дисертацията

Дисертацията има за цел да представи нови експериментални данни и приложно ориентирани познания касаещи омокрящите, ледофобни и антимикробни характеристики на саждите от рапично олио, и тяхното значение за бъдещото производство на иновативни биосензори или криогенни устройства за безвредно криосъхранение на жива материя.

Изхождайки от гореизложената мотивация и поставената цел, можем да формулираме *задачите* на настоящата дисертация, както следва:

1. Да се разработят персонализирани сензорни устройства на основата на кварцова микровезна покрита със слой от въглеродни сажди, способни да регистрират множество

процеси и биохимични компоненти в човешки еякулати и урина за целите на клиничната диагностика;

2. Да се изследва систематично антимикробното поведение на саждите от рапично олио при статични и динамични условия в соленоводен басейн;

3. Да се изяснят в дълбочина всички фактори регулиращи противообледеняващата способност на саждите от рапично олио в среда с висока относителна влажност на въздуха;

4. Да предложи и обясни в детайли иновативна нанотехнология за криоконсервация на човешка семенна течност чрез неомокряеми покрития от въглеродни сажди;

5. Да се изследва ефектът на саждите от рапично олио върху подвижността, акрозомния статус и окислително-редукционния потенциал на човешки сперматозоиди;

Методи на изследване и научна апаратура

В дисертацията са използвани специализиран компютърен софтуер Sperm Class Analyzer 6.0.0.2 Microptic S.L. (Испания, Барселона) и QCM200 LabView Stand Alone Application (SRS, САЩ). По време на експериментите са използвани аналитично устройство QCM200, инкубатор, ламинарен бокс, оптичен микроскоп, камера MAKLER, лабораторно конструирано криогенно съоръжение, апаратура за охарактеризиране на твърди повърхности, включително сканиращ електронен микроскоп, рентгенов фотоелектронен спектрометър, атомно-силов микроскоп, оптичен система за измерване на ъгли на омокряне OCA15 EC (DataPhysics, Германия), горивна система за контролирано горене на рапично олио и спектрофотометър LAMBDA 1050 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, САЩ).

В рамките на дисертацията са разработени следните нови методики:

- Метод за оценка на постеякулаторната динамика на коагулация и втечняване на човешки еякулат;
- Метод за комплексен биохимичен анализ на човешка урина;
- Метод за проследяване на динамиката на замръзване на статични водни капки;
- Метод за получаване на износоустойчиви покрития от въглеродни сажди легирани със сребро;
- Метод за криоконсервация на човешки сперматозоиди;
- Метод за функционална активация на човешки сперматозоиди;

Научна новост

Всички резултати от дисертацията са публикувани в реномирани международни научни списания с импакт фактор, попадащи изцяло в квартали Q1 и Q2 за периода на издаване 2019-2024 година, и са представени на редица престижни международни конференции като *International Conference on Diamond and Carbon Materials*, *The Annual Meeting of the Society for Cryobiology* и *Designer Biology*. В дисертацията са описани два уникални научни приноса (резултати, които отварят съвсем нова страница в развитието на дадена научна област), както и още четири, които добавят съществено ново познание към досега известното.

Приложимост и полезност

Включените в дисертацията публикации са получили общо 104 независими цитирания към датата на предварително обсъждане на дисертационния труд, като общият импакт фактор на дисертацията е 57.5. По темата на дисертацията са реализирани успешно няколко научни проекта, финансирани от фонд „Научни изследвания“ и различни изследователски програми на Българска академия на науките. Разработените в рамките на тази дисертация методи за функционална активация и криоконсервация на човешки сперматозоиди са проверени в реална клинична среда.

Научни публикации

Дисертацията е изградена върху общо петнадесет публикации с импакт фактор, квартал Q1 и Q2, които не са били използвани при предходни процедури за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, както и в конкурси за заемане на академичните длъжности „главен асистент“ и „доцент“.

Характер на дисертацията

Дисертацията има силно изразен научно-приложен и експериментален характер.

Обем и структура на дисертацията

Дисертацията се състои от пет глави, като глава I представлява литературен обзор на съвременното състояние на техниката, а глави II, III, IV и V, по същество, описват проведените изследвания, получените от тях резултати и основни изводи. В края са изброени основните научни и научно-приложни приноси и е приложен списък на включените в дисертацията публикации. Обемът на дисертацията е 234 страници,

включващи 117 фигури, 34 таблици и 22 формули и уравнения. Цитирани са 433 литературни източника.

СЪДЪРЖАНИЕ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

ГЛАВА I: СЪВРЕМЕННО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Тази част представлява литературен обзор, въз основа на който са очертани научните области залегнали в дисертационния труд. Идентифицирани са нерешените проблеми и научните тематики, в които съществуват недостатъчно по качество и количество изследвания, резултати и изводи. На тази база са формулирани целите и задачите на дисертацията.

ГЛАВА II: КВАРЦОВА МИКРОВЕЗНА ПОКРИТА С НЕОМОКРЯЕМ СЛОЙ ОТ ВЪГЛЕРОДНИ САЖДИ, КАТО БИОСЕНЗОР ЗА АНАЛИЗ НА ЧОВЕШКА СЕМЕННА ТЕЧНОСТ И УРИНА

1. Мотивация

Вискозитетът на семенната течност заедно с няколко биохимични показателя на човешката урина могат да служат като прогнозни маркери за здравословното състояние на репродуктивните и отделителните органи. И двата анализа, на сперматозоиди и урина, се извършват посредством достъпни качествени или полуколичествени методи, включващи измерване на дължината на семенната нишка, времето за запълване на еякулата в капилярно заредена камера или лабораторни тестове с лакмусни ленти. Основен недостатък на тези методи е невъзможността за адекватно разпознаване на индивидуалните характеристики на семиналната плазма (напр. концентрация на сперматозоиди, обем на течността, вискозитет, етапи на коагулация и втечняване) веднага след еякулация или възможността за погрешно тълкуване на резултата поради субективна проверка на цвета на тънките пластмасови ленти, потопени в урината, което води до фалшиво положителна или фалшиво отрицателна диагноза.

Количествената оценка на човешка семенна течност и урина е осъществима чрез електросеменография, реометрия, електрофореза, волтаметрия, електрохимични сензори, хартиени чипове, раманова спектроскопия и тандемна масспектрометрия с инжектиране на поток. Въпреки тяхната доказана надеждност, споменатите подходи не успяват да регистрират морфокинетичните характеристики на пробите от сперма и не могат да проследят повече от два компонента на урината (напр. урея/креатинин, пикочна

киселина/креатинин) , което възпрепятства детайлното диагностициране на текущото функционално състояние на репродуктивната и отделителната система. Следователно, изобретяването на универсален (приложим за анализ на двете телесни течности), рафиниран и евтин лабораторен метод, който да замени гореспоменатите подходи, определено би улеснило медицинското съсловие да идентифицира и лекува пациенти с влошена сперматогенеза, анормален семенен вискозитет и/или сърдечно-съдови заболявания.

2. Регистрация на постеякулаторната динамика на човешка семенна течност

2.1. Теоретични основи на изследването

Кварцовата микровезна (КМВ), изобретена от немския физик Гюнтер Зауербрай през 1959 г. и състояща се от миниатюрен дискообразен кварцов кристал с два кръгли метални електрода от двете му страни, променя своята честотна характеристика в течности пропорционално на техния вискозитет η и плътност ρ :

$$\Delta f = -f^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\rho\eta}{\pi\mu_q\rho_q}} \quad (1),$$

където $\pi\mu_q\rho_q$ обозначава акустичния (електромеханичен) импеданс на кварца. Кварцовата микровезна е аналитичен инструмент за различни сензорни приложения в течна среда, където електромеханичната връзка между еластичните напречно-хоризонтални вълни разпространяващи се в кристала и в течността, генерира експоненциално затихване на трептенията в рамките на дълбочина на проникване на електромеханичната вълна:

$$\delta = \sqrt{\frac{\eta}{\pi f \rho}} \quad (2)$$

При 5 MHz резонансна честота и среда на водна основа, $\delta \sim 250$ nm и разсейването на вълновата енергия се изразява като увеличено динамично съпротивление R:

$$\Delta R = \left(\frac{n\omega L}{\pi}\right) \cdot \left(\sqrt{\frac{2\omega\rho\eta}{\mu_q\rho_q}}\right) \quad (3),$$

където n – брой страни в контакт с течността, ω – ъглова честота при сериен резонанс, L – индуктивност при ненатоварен (сух) сензор.

Представената теория е валидна за хидрофилни повърхности на КМВ, характерни с граничното условие „липса на приплъзване“, но когато омокряемостта на кварцовия кристал се промени на хидрофобна или свръххидрофобна, сензорният сигнал започва да

зависи от стойността на междупазовата енергия твърдо тяло-течност γsl . В резултат на това, промените в резонансната честота и динамичното съпротивление се различават значително от референтните стойности пресмятани чрез уравнения (1) и (3), което е основа за високочувствителна детекция на преходи в състоянието на омокряне на дадена твърда повърхност, биомолекулни взаимодействия, антимикробна активност или оценка на качеството на човешки сперматозоиди.

Добре известно е, че след еякулация семенната течност има вид на желатинов гелообразен секрет, съдържаща секрети от семенни везикули (семеногелини) и простатен специфичен антиген (PSA), отговорен за втечняването на семиналната плазма, чийто обемни съотношения определят семенния вискозитет. Отлагането на суров еякулат върху покритата със сажди повърхност на сензора, следва да доведе до мигновено понижение на честотата и повишение на съпротивлението, предизвикано от продукта вискозитет-плътност на гелообразната суспензия. Тъй като отделеният еякулат незабавно се трансформира в коагулум, в определен диапазон от време се очаква честотната характеристика да бъде права линия поради постоянните вискоеластични свойства на течността. Началото на втечняването на еякулата следва да се прояви чрез допълнителни изменения в честотата и съпротивлението, но вероятно в посока, обратна на първоначалната. След като втечняването бъде прекратено (забавено), реакцията на сензора ще придобие праволинейна форма.

2.2. Методология

Постеякулационната динамика на коагулация и втечняване на еякулата се изследва на място и се записва чрез напълно автоматизиран аналитичен инструмент QCM200, включващ самостоятелен компютърен софтуер LabView, инсталиран на персонален компютър (PC). Сензорната платформа се състои от цифров контролер с вграден честотомер и омметър, държател за кварцов кристал и сензорен осцилатор SRS25. Непрекъснатите отчитания на резонансната честота f_r , динамичното съпротивление R и отместената на единица площ маса m се регистрират автоматично и се записват на компютъра през 1 s след ръчно нулиране на статичния капацитет C_0 чрез десетоборотния модулатор на цифровия контролер.

По време на експериментите, две покрити със сажди 5 MHz KMB се поставят една по една в кристалния държател, който е предварително почистен с етанол (70%, Sigma Aldrich, САЩ). След като сензорният сигнал във въздушна среда се стабилизира ($\Delta f \pm 1$ Hz), суровият еякулат незабавно се взема и се разпределя внимателно в централната част

на повърхността на сензора чрез пипета. След това се наблюдава отклика на КМВ във времето, докато наблюдаваните промени в честотата, съпротивлението и отместената маса достигнат относително постоянни стойности съответно от ± 1 Hz, ± 1 Ω и $\pm 0,5$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Описаната процедура се повтаря в четири независими експериментални цикъла за двама пациенти, като се използват общо осем КМВ покрити със сажди, отчитайки сексуална активност на пациентите в реалния живот. Например, пациент А има два или три сексуални акта с партньора си на дневна база, докато пациент В само един. За да се пресъздаде ситуация от реалния живот, съответстваща на семенна течност със специфични и променливи параметри (напр. обем, концентрация и подвижност), базираният на КМВ анализ на спермата за пациент А се изпълнява в два последователни дни с две еякулации на ден (2 часа пауза между първата и втората еякулация), докато анализите за пациент В се извършват в четири последователни дни с една еякулация на ден. Всички тестове се изпълняват при еднакви и постоянни условия на околната среда ($T \sim 21,5 \pm 1$ °C; $RH \sim 27 \pm 2\%$), като по този начин се избягва каквото и да е влияние на околната среда върху семенните характеристики от експеримент до експеримент.

2.3. Основни характеристики на еякулатите на двамата пациенти

Преди извършване на сензорните измервания, и двамата доброволци са подложени на компютърно-асистирана оценка на качеството на семенната течност, резултатите от която са обобщена в таблица 1.

Таблица 1: Параметри на семенната течност на пациенти А и В.

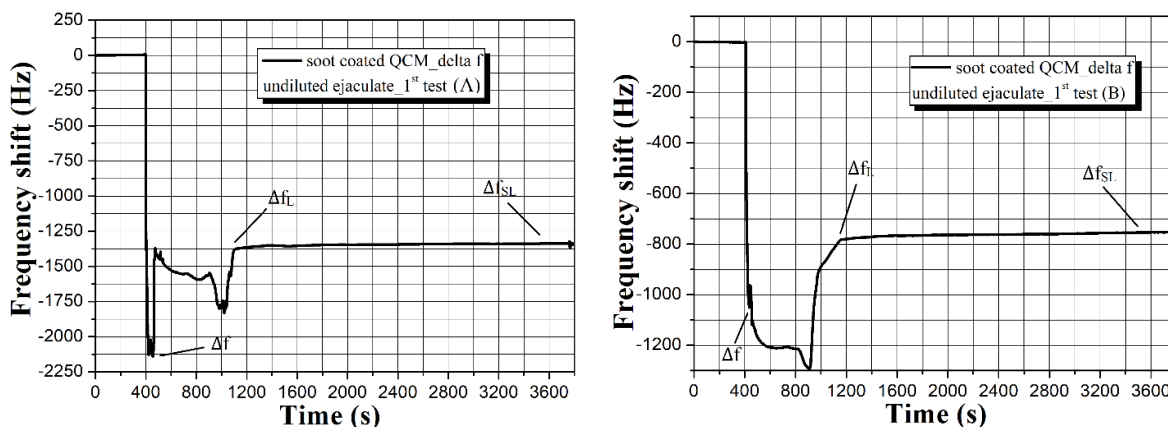
Patient	Viscosity	Volume V (mL)	Conc. C (Mln/mL)	Motile (type a+b+c) %	Progressively motile (type a+b) %	Non-progressive (type c) %	Immotile (type d) %
<i>A_Day1_1st test</i>	hyper	0.7	38.5	67.6	35.7	31.9	32.4
<i>A_Day1_2nd test</i>	hyper	0.2	37.1	47.2	28.2	19	52.8
<i>A_Day2_3rd test</i>	hyper	0.7	45.2	39.5	10.8	28.7	60.5
<i>A_Day2_4th test</i>	hyper	0.2	68	47.9	14.5	33.4	52.1
<i>B_Day1_1st test</i>	normal	0.5	3.6	34.4	26.2	8.2	65.6
<i>B_Day2_2nd test</i>	normal	0.5	15.8	81.1	64.6	16.5	18.9
<i>B_Day3_3rd test</i>	normal	0.5	7.9	51.3	39.5	11.8	48.7
<i>B_Day4_4th test</i>	normal	0.5	11	49.9	39.9	10	50.1

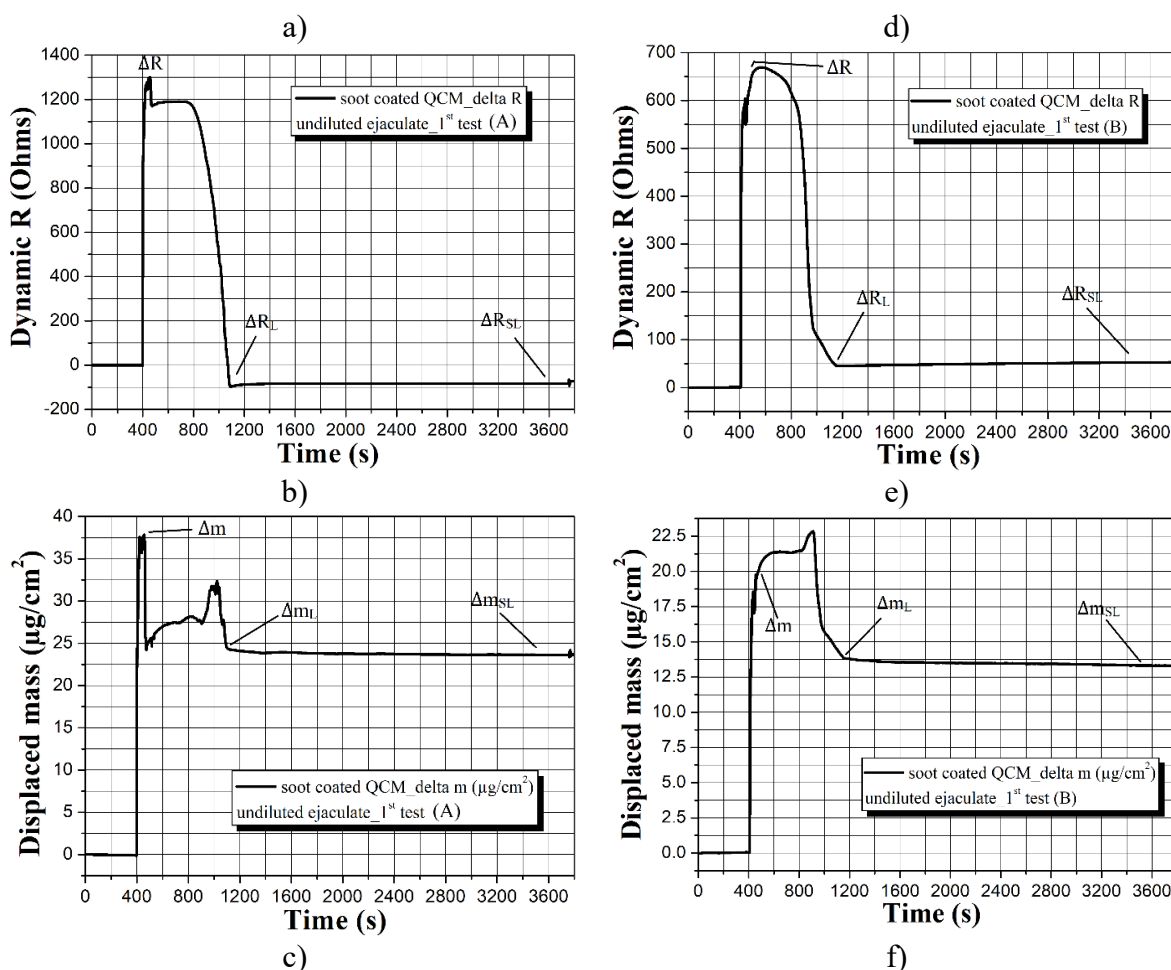
Числовите данни разкриват няколко индивидуални вариации (най-вече свързани с подвижността), но също така и три основни и повтарящи се разлики между еякулатите на пациенти А и В. Независимо от честотата на еякулация, семенната течност на пациент

А е хипервискозна и концентрациите на сперматозоидите варират в рамките на $C_A \sim 40-70 \text{ mln/mL}$. Пациент В има нормален вискозитет на еякулата, но много по-малък брой сперматозоиди $C_B \sim 4-16 \text{ милиона/mL}$. Обемът на семенната течност на двамата доброволци също е различен и приблизително 40% по-висок за пациент А в сравнение с пациент В при първа еякулация ($V_A = 0,7$; $V_B = 0,5 \text{ mL}$). Втората дневна еякулация на пациент А води до 3,5 пъти по-малък обем течност (виж Таблица 1). Според номенклатурата на Световната здравна организация, първият доброволец е с нормозооспермия, докато другият проявява лека до умерена олигозооспермия. Наличието на двама пациенти със значително различни семенни течности е предпоставка за недвусмислено валидиране/отхвърляне на предложения изследователски подход и лекота при тълкуване на показанията на сензора.

2.4. Анализ на постеякулаторната динамика на човешка семенна течност чрез неомокряема КМВ

Този раздел представя нова концепция за количествен анализ на постеякулаторната динамика на човешки семенни течности чрез КМВ покрити със сажди. Фигура 1 илюстрира развитието на сензорния отклик във времето, предизвикано от необработените еякулати на пациенти А и В, а бърз преглед на графиките разкрива няколко основни характеристики на сигналите, генерирани от спермата на двамата доброволци. Независимо от вида на еякулата, покритите със сажди КМВ намаляват своята резонансна честота, след като отделената гелообразна течност се разпредели върху сензорната повърхност. След известно време честотата се увеличава на две фази - рязко в кратък период от време и след това постепенно с много по-бавна скорост. Тенденциите на динамичното съпротивление и изместената маса са противоположни на тези на резонансната честота (т.е. понижението в честотата е придружено от увеличаване на съпротивлението и масата и обратно), в съответствие с уравнения (1) и (3).



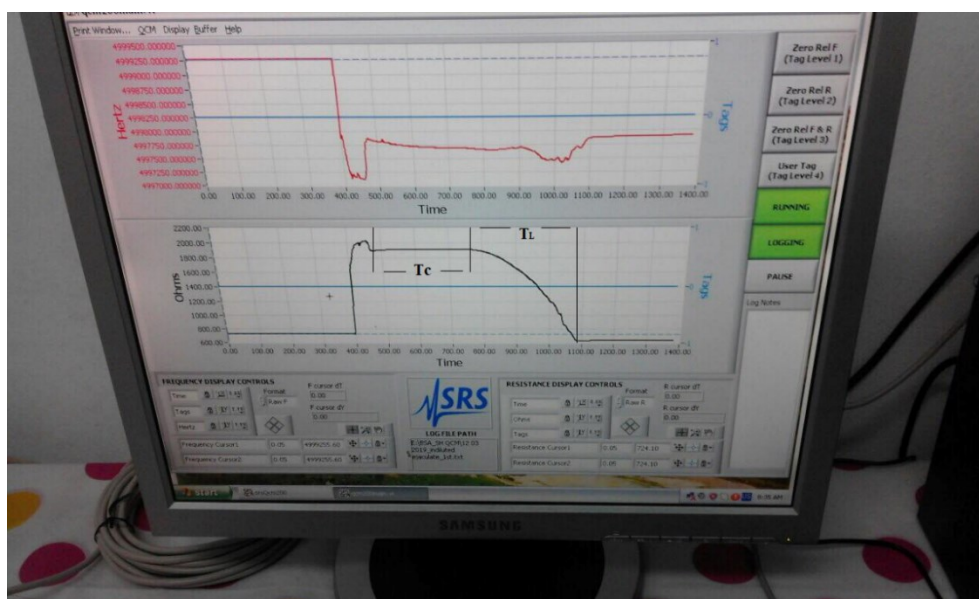


Фигура 1: Развитие на сензорния сигнал във времето, предизвикано от суровите еякулати на (а-с) пациент *A* and (d-f) пациент *B* при първите тестове.

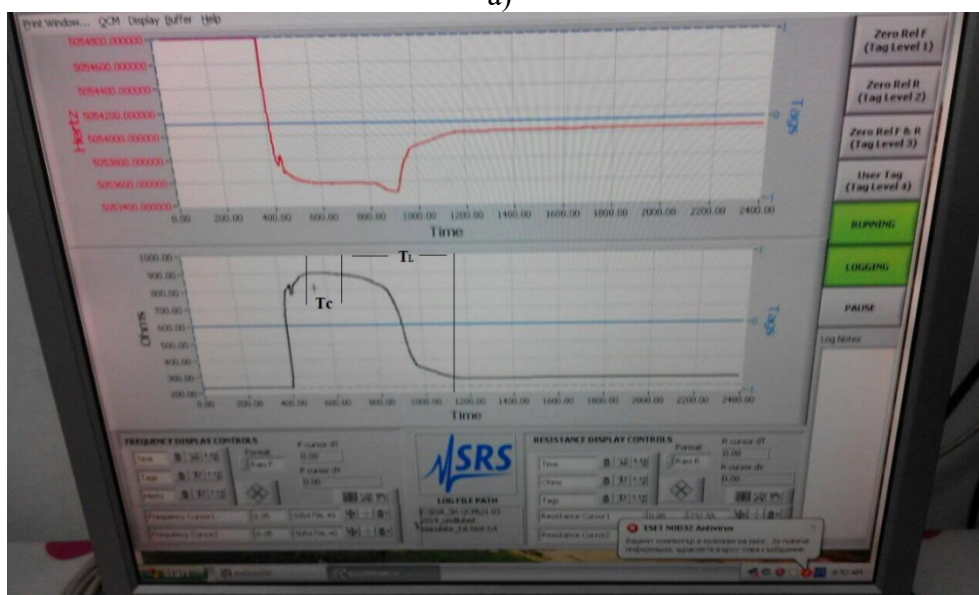
Анализирайки регистрирания резонансен отклик става ясно, че получените сигнали се дължат на реални събития на границата твърдо-течно вещество и могат да бъдат очертани три основни групи параметри, а именно $(\Delta f, \Delta R, \Delta m)$, $(\Delta f_L, \Delta R_L, \Delta m_L)$ и $(\Delta f_{SL}, \Delta R_{SL}, \Delta m_{SL})$. Тези групи, идентифицирани спрямо базовата линия ($\Delta f = 0$ Hz), съответстват на максималната резонансна честота, динамичното съпротивление и отместената маса, предизвикани от продукта вискозитет-плътност на гелообразната семенна течност веднага след еякулация и по време на първата (бърза) и втората (бавна) фази на втечняване. Могат да се забележат явни разлики в числовите стойности на Δf , ΔR , Δm за пациенти *A* и *B*. Например, $\Delta f_A \sim 2125$ Hz, $\Delta R_A \sim 1300$ Ω и $\Delta m_A \sim 37,5$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, докато $\Delta f_B \sim 1050$ Hz, $\Delta R_B \sim 665$ Ω и $\Delta m_B \sim 20$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, демонстрирайки около два пъти по-силен сензорен сигнал, генериран от суров еякулат *A* в сравнение с неговия аналог *B*. Освен това, подобни разлики се забелязват и в другите две групи параметри (виж Фигура 1), точно отразяващи семенните характеристики на два индивида (т.е. хипервискозна

течност с по-висока концентрация на сперматозоиди, спрямо течност с нормален вискозитет и съответно по-нисък брой сперматозоиди).

Задълбочен анализ на резултатите, чрез представяне на сегмент от необработените данни като Фигура 2, разкрива съществуването на квазилинейна зона в спектрите на динамично съпротивление при пациенти А и В (виж също Фигури 1b и 1e във времевия диапазон от 400-1000 s). В даден момент тя се замества от друга зона с бързо и рязко понижение на съпротивлението, чиято ширина варира от пациент до пациент (виж Фигура 2).



a)



b)

Фигура 2: Необработен сензорен сигнал (моментна снимка) на 5 MHz KMB покрита със сажди, предизвикан от суровия еякулат на а) пациент А (част от Фигура 1a-1b) и б)

пациент *B* (част от Фигура 1d-1e) и използван за определяне на продължителността на семенна коагулация T_C и първа фаза на бързо втечняване T_L . Снимките са снети при запис на сензорните данни в реално време.

Тъй като семиналната плазма коагулира мигновено при еякулация и знаейки, че R отчита вискозните ефекти, квазилинейните и стръмни фракции могат с достатъчна увереност да бъдат отдадени на времето за постеякуляторна коагулация на еякулата и първата фаза на бързо втечняване, обозначени съответно като T_C и T_L . В действителност, обсъдените по-горе спектрални зони се откриват във всичките четири експериментални цикъла с всеки пациент (виж pdf файла на дисертационния труд).

За по-добро тълкуване и сравнение на регистрираните резонансни криви, цялата информация е събрана в таблица 2.

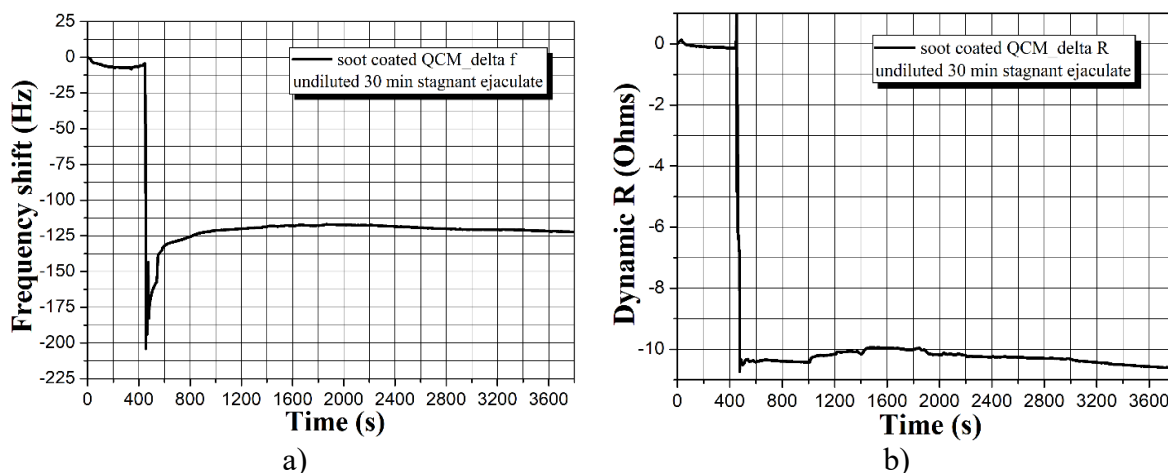
Таблица 2: Обобщение на данните от сензорния отклик на осем КМВ покрити с въглеродни сажди, предизвикан от суровите еякулати на пациенти *A* and *B* в рамките на четири независими експериментални цикъла.

Patient	Δf (Hz)	Δf_L (Hz)	Δf_{SL} (Hz)	ΔR (Ω)	ΔR_L (Ω)	ΔR_{SL} (Ω)	Δm ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Δm_L ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Δm_{SL} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	T_C (s)	T_L (s)	
A	1 st	-2125	-1375	-1338	1300	-100	-83	37.5	24	23.6	300	330
	2 nd	-2000	-625	-594	1525	-50	-43	35	10.9	10.5	100	400
	3 rd	-2300	-688	-650	1870	0	62	40.5	12.5	11.5	200	380
	4 th	-2120	-250	-380	1800	650	1000	36	5	7	0	550
B	1 st	-1050	-780	-752	665	45	53	20	13.8	13.3	230	400
	2 nd	-1700	-788	-660	700	-52	-57	30	13.9	11.6	100	240
	3 rd	-2780	-875	-840	438	-3	-3	50	15.5	14.9	50	370
	4 th	-1400	-500	-455	375	15	18	25	9	8	10	200

Според тази таблица, еякулатът на пациент *A* предизвиква по-силен сензорен сигнал, коагулира и се втечнява по-бавно в сравнение с аналог *B* и подобна тенденция е видима при всички измервания. Интересно е, че чрез преминаване от първа към втора ежедневна еякулация на пациент *A*, общото време на коагулация и първата фаза на бързо втечняване (T_C+T_L) намалява (виж Таблица 2). Това е недвусмислено доказателство, че покритата със сажди КМВ разграничава съдържанието на PSA и семеногелини в семиналната плазма, което намалява пропорционално на честотата на еякулация. Междувременно, пониженият обем семенна течност и/или концентрация на сперматозоиди при втората дневна еякулация на пациент *A* (виж таблица 1) винаги водят до по-слаб сензорен отклик (виж таблица 2), което означава, че така разработената сензорна конфигурация

разпознава количествено особеностите на човешкия еякулат (обем, концентрация, вискозитет, коагулация и втечняване).

За да се потвърди, че тези резултати не са плод на случайни явления (измервателна грешка), КМВ покрита със сажди се натоварва с човешки еякулат престоял 30 min в инкубатор, както е показано на фигура 3.



Фигура 3: Изменение във времето на а) резонансната честота и б) динамичното съпротивление на 5 MHz КМВ покрита със сажди при натоварване на активната повърхност с еякулат престоял 30 min в инкубатор.

Очевидно откликът предизвикан от такъв еякулат е относително постоянен във времето с незначителни отклонения на честотата и съпротивлението от ± 10 Hz и $\pm 0,5$ Ω . Нещо повече, низходящото движение на R с $\sim 10,5$ Ω е идентично с това, забелязано при потапяне на сензора в среда за оплождане Global за среда за оплождане или бактериални суспензии на водна основа с постоянен вискозитет. В рамките на 30 минути еякулатът се трансформира от гъста субстанция на водна основа, подобна на слуз, във водниста течност, което води до „разделяне“ на сензорния сигнал (по-слаб такъв) поради слабото омокряне, което локализира на трептенията предимно в обема на кристала и не позволява преминаването им в течността. Това е така, тъй като захващането на въздушни джобове на границата твърдо тяло-течност, вследствие ефекта на свръххидрофобност, води до формиране на рязка акустична граница между твърдотелния интерфейс и течността, поради огромна разлика в акустичните импеданси на твърдите тела и въздуха. Може да се заключи, че значителна част от сензорния сигнал ($\sim 80\%$) се предизвиква от промени във вискозитета и разлики в плътност на еякулата, докато обемът му и подвижността на гаметите имат по-слаб ефект. Подобни твърдения се подкрепят от факта, че 0.2 mL хипервискозен еякулат предизвикват по-силен отклик от 0.5 mL

нормална семенна течност (виж таблици 1-2), което недвусмислено потвърждава валидността на представените научни хипотези. Възможността за подробен анализ на необработени човешки еякулати чрез КМВ покрити със сажди, нарежда тези устройства до няколко изключително иновативни инструмента за анализ на качеството на семенна течност, като рН-чувствителни полеве транзисторни сензори, микроконзолни сензори с нанодвижение, микрофлуидни чипове и корентропно-медирана пространствено-времева обработка на видео.

3. Комплексен биохимичен анализ на човешка урина чрез КМВ покрити с неомокряеми въглеродни сажди

3.1. Вземане на проби от човешка урина и експериментална постановка

Целта на това изследване е да насочи интереса на научната общност към една изключителна и все още неизследвана възможност за комплексно охарактеризиране на човешка урина чрез свръххидрофобни КМВ покрити със сажди, чийто усъвършенстван механизъм на детекция е свързан с преход от неомокряемо до напълно омокряемо състояние на сензорния интерфейс от сажди (т.е. преминаване от непроникваща към напълно проникваща в повърхността течност), като функция на биохимията на урината, т.е. концентрации/съотношения на рН, протеин, урея, креатинин и пикочна киселина.

Проби от прясна човешка урина се взимат от трима донори в добро здравословно състояние, разглеждани като пациенти *A*, *B* и *C*, след сутрешно уриниране в стерилни пластмасови съдове в два последователни дни. Около 5 mL от всяка прясна урина (общо шест проби) се изпращат за външен биохимичен анализ в независими лицензирани медицински лаборатории IMDL Ramus и Cibalab, София България, а други 5 mL от течността се съхраняват в лаборатория „Акустоелектроника” към ИФТТ-БАН, София България, за анализи посредством неомокряеми КМВ. След 10 дни престой в хладилник, всички проби се изследват отново в опит да се свърже биохимичният състав на човешката урина с генерираните сензорни сигнали и контактните ъгли на статични капчици урина.

Комплект от дванадесет покрити със сажди 5 MHz КМВ се поставят една по една в сензорния държател на аналитичното устройство QCM200, предварително стерилизиран с етанол (99 тегл.% Валерус ООД, България), и когато наблюдаваните колебания на сигнала достигнат необходима стабилност във въздух (напр. ± 1 Hz/s) 1 mL човешка урина се разпределя равномерно върху неомокряемата повърхност чрез стерилна пипета. Изменението на резонансния отклик във времето се наблюдава докато

трептенията на сензора прескочат на фалшива честота или се започнат да се регистрират относително постоянни стойности на честотата, съпротивлението и отместената маса (напр. ± 1 Hz, $\pm 1 \Omega$, $\pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Едновременно с тези изследвания, около 30 μL капчица от тестваната урина се фиксира върху покрито със сажди микроскопско стъкло и промяната на ъгъла на омокряне във времето също се записва чрез системата OSA15 ES (DataPhysics, Германия). Тази процедура се повтаря в четири независими експериментални цикъла (две пресни и две застояли проби) за пациенти А, В и С при относително еднаква и постоянна температура на околната среда и течността от $\sim 22 \pm 1$ °C.

За да се изясни основният механизъм на взаимодействие между саждите и урината, и за да се свържат показанията на КМВ с динамиката на омокряне от урината, се извършват няколко контролни експерименти. Първо, 30 mL от две пресни проби урина се изсипват в шест стерилни епруветки от 5 mL, образувайки две групи проби от по три епруветки. Първите епруветки от всяка група се оставят като контрола, докато останалите епруветки се пълнят с 5 μL NaOH или HCl (1:0,001 обемни % разреждане), за да се преобразува pH на разтвора в силно алкално (pH = 10-11) или съответно кисело (pH = 3-4). След това, 30 μL капка урина от всяка епруветка се поставя върху покрито със сажди предметно стъкло и се записват промените в омокряемостта на повърхността. Второ, 30 μL капчици човешка урина се разпределят върху две покрития от сажди с различна степен на окисление и скоростта на преходите на омокряне също се записва. Трето, три покрития от сажди с дебелина $d \sim 25 \mu\text{m}$ се потапят в урината на тримата донори за 120 min и след това тяхната дебелина се измерва отново, за да се разбере дали ефектът на урината е повърхностен или обемен. Накрая, слабо и силно окислени проби от сажди се анализират с помощта на рентгенов фотоелектронен спектрометър ThermoFisher ESCALAB 250 и химичните връзки се извличат от фотоелектронните спектри. Тези проби се потапят за 240 минути в два съда пълни с 50 ml прясна урина и биохимията на приготвените разтвори се идентифицира в Cibalab, София България.

3.2. Анализ на пробите от урина в лицензирани лаборатории

Успоредно с КМВ анализите, биохимичният състав на пробите от урина се анализира в IMDL Ramus и Cibalab, София България, като резултатите са представени в таблици 3-4. Данните предоставени от акредитираните медицински лаборатории показват няколко големи разлики между урината на тримата доброволци, а именно урината на пациент С съдържа най-малкото количество протеин, креатинин и пикочна киселина, в сравнение

с другите двама донори (виж Таблица 3) . Освен това, съотношенията на биохимичните компоненти в пресните проби (напр. протеин/креатинин, протеин/урея, протеин/пикочна киселина) постепенно намаляват при преминаване от пациенти *A* към *C*, придружено от увеличаване на съотношението урея/креатинин приблизително два пъти (виж таблица 4). Успешното откриване на тези разлики, заедно с рН на разтвора, е от съществено практическо значение, тъй като може да служи като инструмент за ранна диагностика на нефропатия, преренална азотемия или остра тубулна некроза. Други съединения, включително глюкоза, кетони, билирубин, уробилиноген, левкоцити, нитрити и др., не са показани, тъй като те са качествено определени (т.е. отрицателни или положителни).

Таблица 3: Количествени лабораторни данни за урината на пациенти *A*, *B* и *C*.

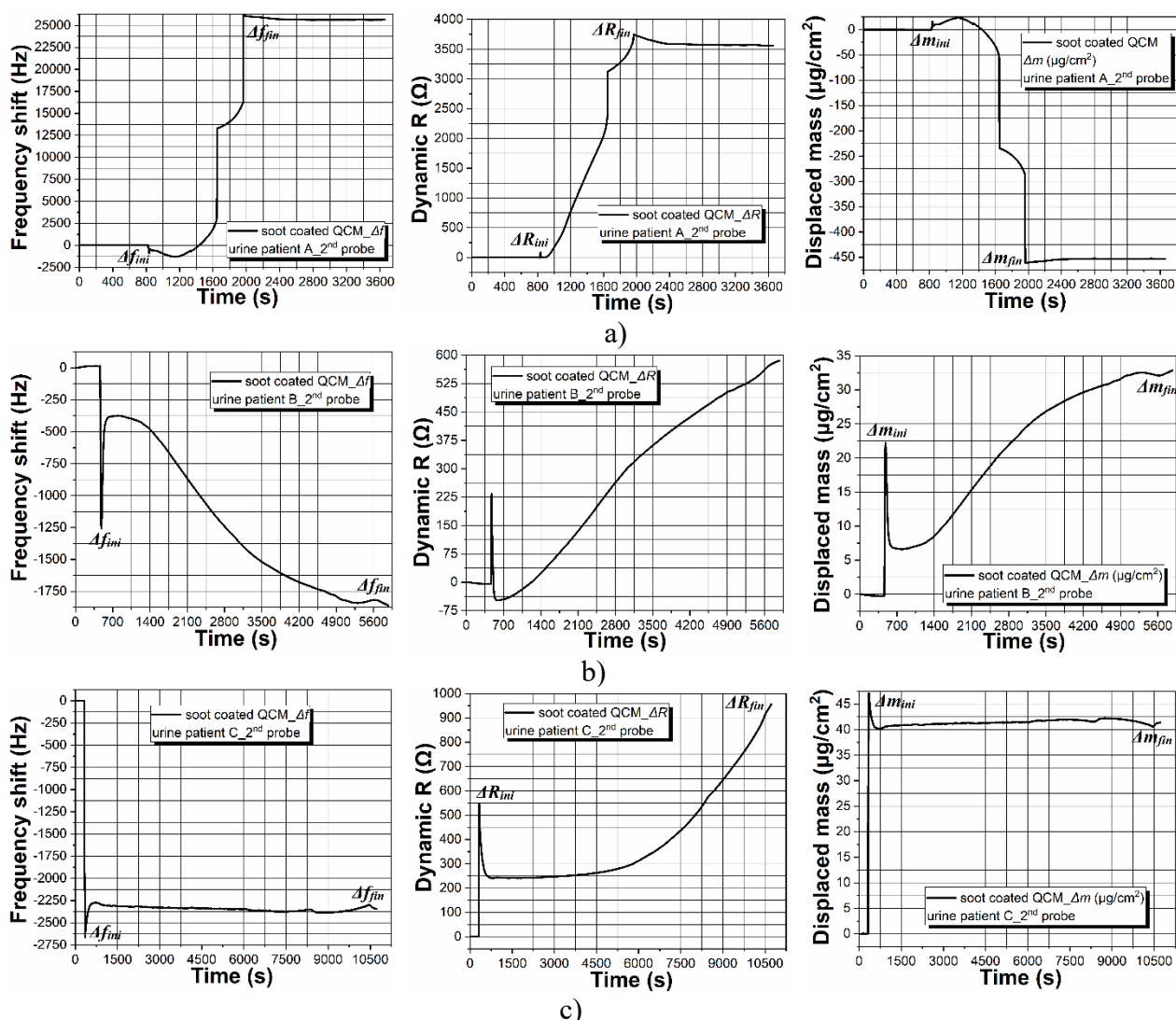
Patient	Type of urine	pH	Protein (mmol/L)	Creatinine (mmol/L)	Uric acid (mmol/L)	Urea (mmol/L)
<i>A_1st probe</i>	fresh	5	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days	5	0.49	9.82	2.02	180.2
<i>A_2nd probe</i>	fresh	7.5	0.92	14.65	2.89	185.1
	10 days	7	0.92	13.89	2.93	189.9
<i>B_1st probe</i>	fresh	5	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days	4.5	0.57	10.24	2.53	233.8
<i>B_2nd probe</i>	fresh	5	1.03	20.18	4.59	301.6
	10 days	5	0.91	18.61	4.65	318.5
<i>C_1st probe</i>	fresh	5	0.43	10.54	2.03	265.8
	10 days	7.5	0.41	10.08	0.88	276
<i>C_2nd probe</i>	fresh	5	0.27	9.77	2.57	241.3
	10 days	7	0.26	9.59	0.56	243.2

Таблица 4: Съотношения на различните биохимични компоненти в урината на пациенти *A*, *B* и *C*.

Patient	Type of urine	pH	Protein/ Creatinine	Protein/ Uric acid	Protein/ Urea	Uric acid/ Creatinine	Urea/ Creatinine
<i>A_1st probe</i>	fresh	5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days	5	0.049	0.243	0.003	0.206	18.4
<i>A_2nd probe</i>	fresh	7.5	0.063	0.318	0.005	0.197	12.6
	10 days	7	0.066	0.314	0.005	0.211	13.7
<i>B_1st probe</i>	fresh	5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days	4.5	0.056	0.225	0.002	0.247	22.8
<i>B_2nd probe</i>	fresh	5	0.051	0.224	0.003	0.227	14.9
	10 days	5	0.049	0.196	0.003	0.250	17.1
<i>C_1st probe</i>	fresh	5	0.041	0.212	0.002	0.193	25.2
	10 days	7.5	0.041	0.466	0.001	0.087	27.4
<i>C_2nd probe</i>	fresh	5	0.028	0.105	0.001	0.263	24.7
	10 days	7	0.027	0.464	0.001	0.058	25.4

3.3. Анализ на пробите от урина чрез неомокряема КМВ

Фигура 4 онагледява сензорния сигнал генериран от покрити със сажди КМВ след поставяне върху повърхността им на 1 mL прясна урина от пациенти *A*, *B* и *C*.



Фигура 4: Резонансен отклик на неомокряема КМВ, предизвикан от свежата урина на а) пациент *A*, б) пациент *B* и в) пациент *C*.

Обстойният оглед на графиките разкрива прилики, но също така и съществени разлики в измененията на резонансната честота във времето и нейните числови стойности от пациент до пациент. Независимо от типа урина, честотата намалява в първия момент на натоварване на сензора с течност, но след това бързо се увеличава при пациент *A* ($\Delta f \sim +27000$ Hz за 1200 s), докато намалява плавно при пациент *B* ($\Delta f \sim -610$ Hz за 5000 s) и изненадващо се превръща в квази права линия при пациент *C* ($\Delta f \sim -125$ Hz за 5250 s). От друга страна, първоначалното понижение в честотата е придружено от увеличаване на динамичното съпротивление, което заедно с „огледалните“ тенденции

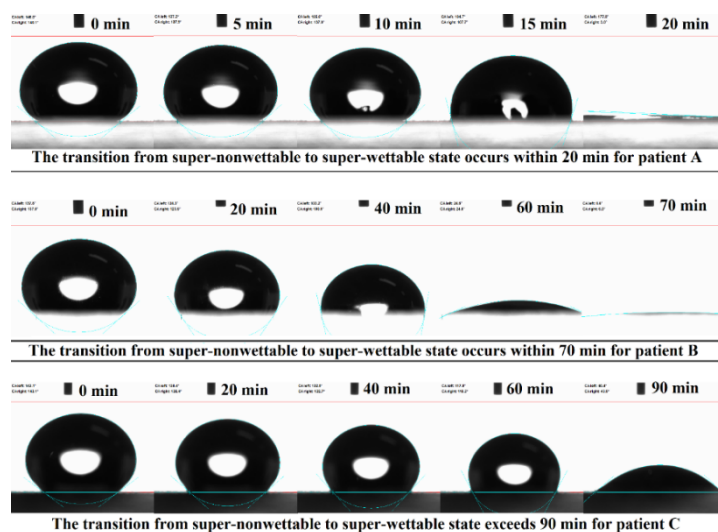
на отместената маса несъмнено потвърждават, че сигналите се дължат на реални физикохимични процеси на границата твърдо тяло-течност. Интересното е, че най-големият отклик (разликата между началната и крайната честота, съпротивление и отместена маса, означени на Фигура 4 съответно като Δf_{ini} , ΔR_{ini} , Δm_{ini} ; Δf_{fin} , ΔR_{fin} , Δm_{fin}) се предизвиква от урината с рН – 7.5, най-ниското съотношение урея/креатинин и най-високите съотношения протеин/креатинин, протеин/пикочна киселина и протеин/урея (виж Фигура 4 и Таблица 4). Подобни резултати, главно по отношение на корелацията на стойностите на рН и честотните промени, са известни в литературата. Тенденцията за понижаване на сензорния сигнал е очевидна при прогресивно понижаване на съотношенията протеин/креатинин, протеин/пикочна киселина и протеин/урея, като същевременно се увеличава съотношението на урея/креатинин в пресните урини (съпоставяне на Таблица 4 и Фигура 4). Резонансните криви са доста възпроизводими от проба до проба (т.е. два еднакви сензора, покрити със сажди, дават подобен отклик към определен външен стимул), ако се има предвид посоката на развитие на сигнала във времето, но неповтаряеми по време на реакция и единични числови стойности (въпреки че кривите са идентични по форма, т.е. възпроизводими, крайният сигнал на сензора е различен).

За да се корелират сензорните показания с биохимията на урината, свежите проби се анализират отново с КМВ след 10 дни съхранение в хладилник. За по-лесно разбиране на данните, те са събрани компактно в Таблица 5.

Таблица 5: Обобщени данни за сензорния отклик на неомокреями 5 MHz КМВ, генериран от свежата и престояла урина на пациенти A, B и C.

Patient	Type of urine	$\Delta f_{fin} - \Delta f_{ini}$ (Hz)	$\Delta R_{fin} - \Delta R_{ini}$ (Ω)	$\Delta m_{fin} - \Delta m_{ini}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
<i>A_1st probe</i>	fresh	10396	1786	-184
	10 days	-129	1078	4
<i>A_2nd probe</i>	fresh	27023	3665	-477
	10 days	-933	1050	17
<i>B_1st probe</i>	fresh	-1422	1324	25
	10 days	-442	248	8
<i>B_2nd probe</i>	fresh	-610	360	11
	10 days	-769	777	14
<i>C_1st probe</i>	fresh	541	-48	-10
	10 days	-461	488	8
<i>C_2nd probe</i>	fresh	325	406	-6
	10 days	-1027	601	18

Както се вижда, застоялата урина на пациент *C* (рН варира в рамките на 7-7,5) усилва сензорния сигнал в сравнение със стойностите на пресните проби (рН-5), напълно противоположно на тенденциите при пациент *A* (виж Таблица 5). Това означава, че вероятно рН на разтвора е един от „основните инструменти“ регулиращи реактивността на урината спрямо саждите и по този начин резонансния отклик. Въз основа на тази хипотеза, заедно със сензорните изследвания се анализират и промените във времето на статичния контактен ъгъл на 30 μL капчици урина (обемът е избран така, че да елиминира всякакви ефекти на изпарение) и резултатът е показан на Фигура 5 и Таблица 6.



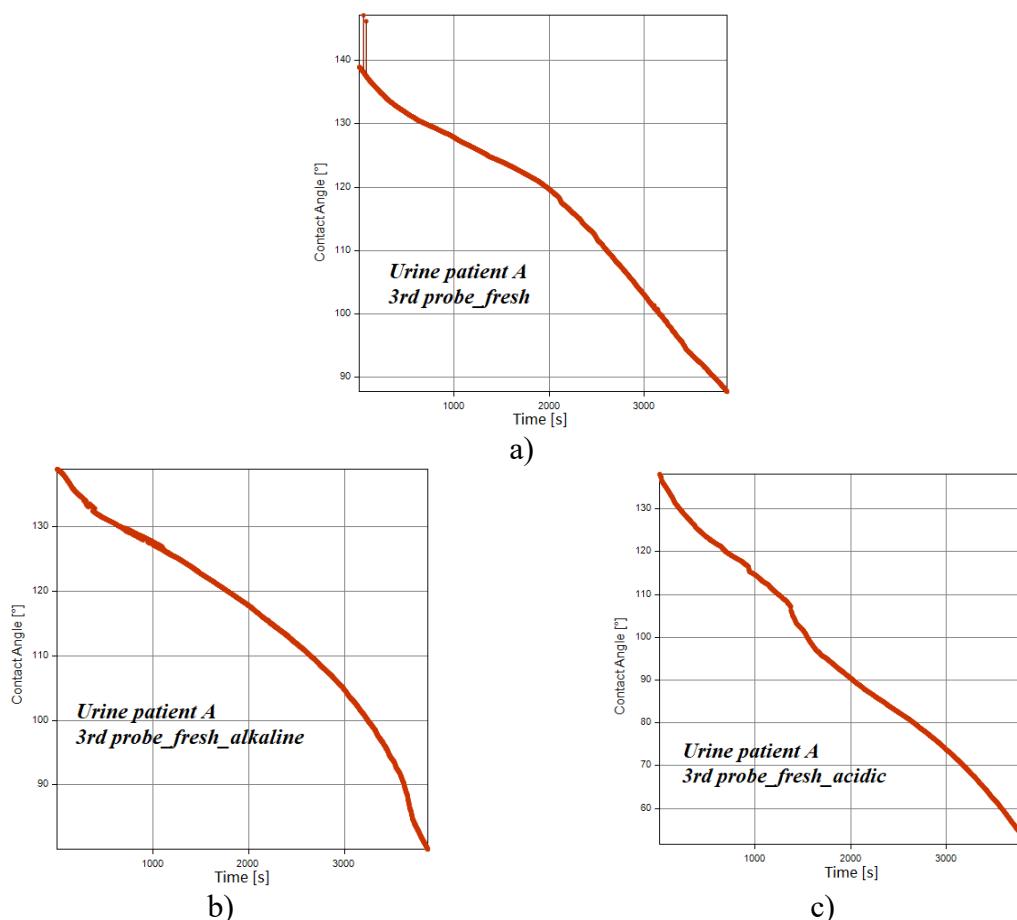
Фигура 5: Скорост на преминаване от неомокряемо към омокряемо състояние на твърдотелния интерфейс при контакт с проби от свежа урина на пациенти *A*, *B* и *C*.

Таблица 6: Изменения в ъгъла на омокряне на капчици от урина на пациенти *A*, *B* и *C*.

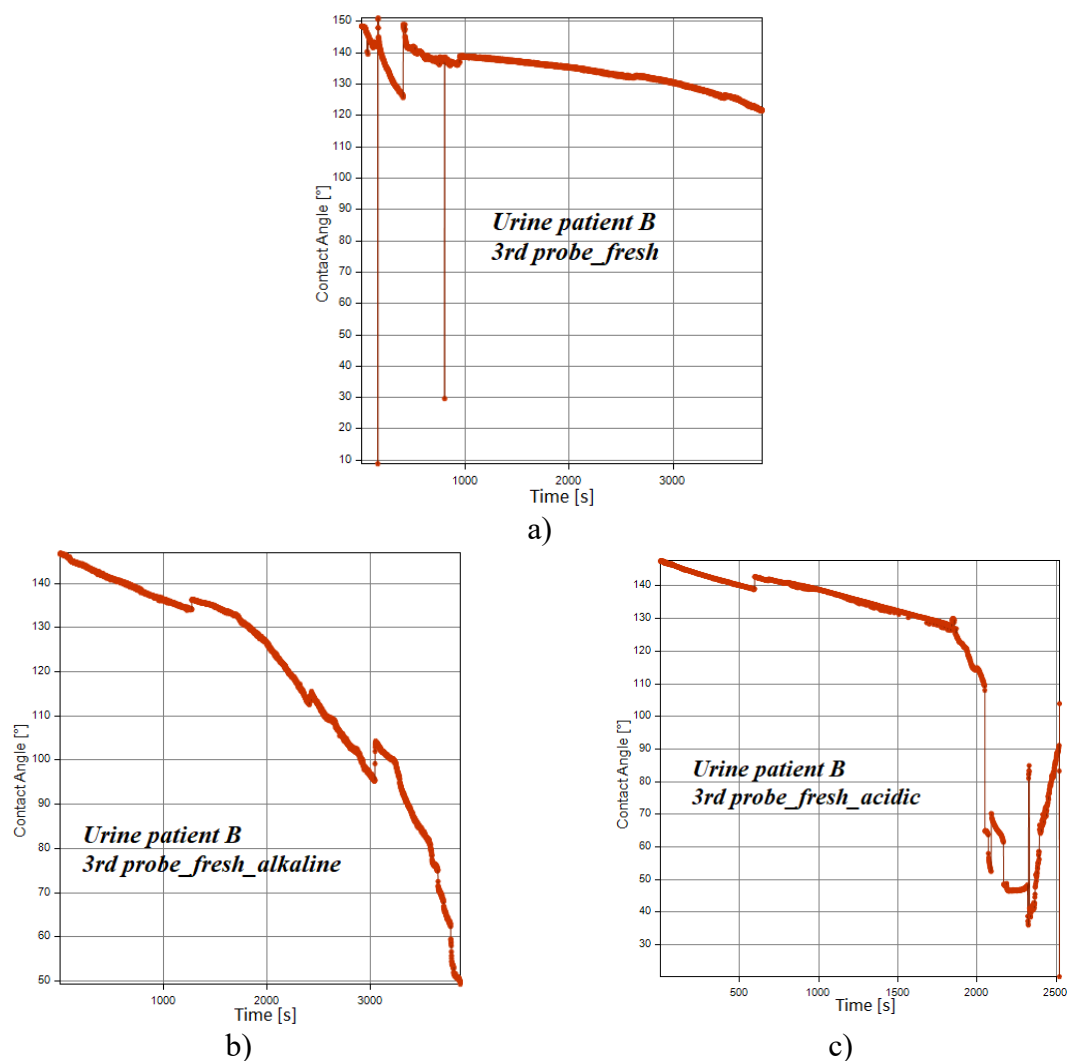
Patient	Type of urine	Volume (mL)	Time (min)									
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
			θ_{ur} (°)									
<i>A_1^{st} probe</i>	fresh	0.03	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days		136	132	122	87	28	≤ 10				
<i>A_2^{nd} probe</i>	fresh		140	136	≤ 10							
	10 days		142	139	133	124	115	99	80	≤ 10		
<i>B_1^{st} probe</i>	fresh	0.03	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	10 days		137	111	96	85	71	51	22	≤ 10		
<i>B_2^{nd} probe</i>	fresh		138	132	124	117	102	54	25	≤ 10		
	10 days		141	126	90	≤ 10						
<i>C_1^{st} probe</i>	fresh	0.03	144	144	144	144	143	143	141	139	135	130
	10 days		144	133	121	106	91	74	45	21	≤ 10	
<i>C_2^{nd} probe</i>	fresh		143	141	138	136	133	127	118	104	79	42
	10 days		137	124	116	111	103	94	83	72	58	≤ 10

Удивително е, че времето, необходимо за пълното проникване на течността в саждите (виж Фигура 5) съвпада с времето, за което сензорът прескача на фалшива честота (1200 s при пациент *A*, както е показано на Фигура 4а) или стабилизира показанията си (4200 s при пациент *B* и над 5400 s при пациент *C*, съгласно фигури 4b-4c). Освен това, при пациент *C* се забелязва много по-висока скорост на омокряне при промяна на рН на урината (вижте Таблицы 4 и 6), което потвърждава, че този показател регулира химичната реактивност на разтвора. Уверено може да се заключи, че резонансното поведение на свръххидрофобните КМВ е доминирано от динамиката на омокряне като функция от биохимията на урината.

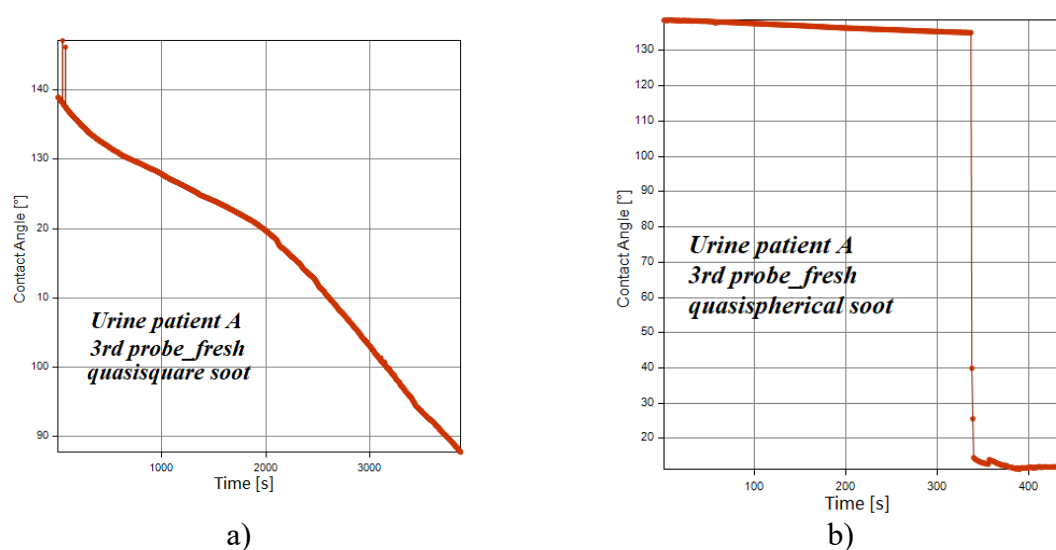
Тези вълнуващи открития изискват провеждането на контролни експерименти, които да изяснят влиянието на рН на урината и химичния състав на саждите върху възникващите междумолекулни сили на привличане. Фигури 6-8 показват как всяка умишлена промяна в рН на разтвора и степента на окисление на саждите (съдържание на кислородни функционални групи) би повлияла върху химическата реактивност на човешката урина.



Фигура 6: Изменения в ъгъла на омокряне (θ_{ur}) на капки от а) необработена, б) алкална и в) кисела урина на пациент *A*.



Фигура 7: Изменения в ъгъла на омокряне (θ_{ur}) на капки от а) необработена, б) алкална и с) кисела урина на пациент *B*.

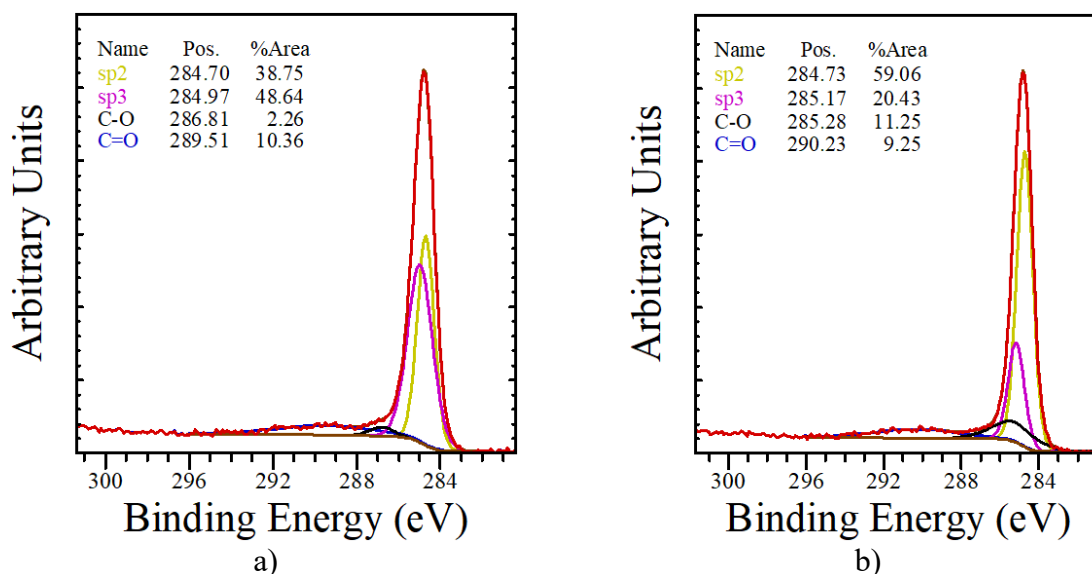


Фигура 8: Изменения в ъгъла на омокряне (θ_{ur}) на капки свежа урина от пациент *A* при наличие на покрития от а) слабо окислени and б) силно окислени сажди със съответно квазиквадратна и квазисферична морфология на частиците и агломератите.

Резултатите показват, че рН е един от параметрите контролиращи скоростта на проникване на урината в саждите. При еднакво време на измерване от 4200 s, киселинната урина на пациент *A* омокря саждите по-добре (рН-4, $\theta_{ur} \sim 50^\circ$) в сравнение както с непреработената (рН-7,5, $\theta_{ur} \sim 88^\circ$), така и с алкалната (рН-10, $\theta_{ur} \sim 80^\circ$) двойници (вижте Фигура 8). Повишаването на киселинността на урината при пациент *B* до рН-4 води до пълно омокряне за приблизително 2400 s (виж Фигура 7). Сравнението на времената за срыв в статичния контактен ъгъл на капчиците урина взети от третите пресни проби на пациенти *A* и *B* (Фигури 6а-7а) показва отлична съотносимост към резултатите получени досега. По-конкретно, урината на пациент *A* е по-реактивна от тази на пациент *B* поради по-високите съотношения протеин/креатинин, протеин/пикочна киселина и протеин/урей, заедно с по-ниските съотношения урея/креатинин и пикочна киселина/креатинин (виж таблица 4). В резултат на това, след 4200 s престой на урината върху повърхността на саждите, контактният ъгъл при пациент *A* намалява до $\theta_{ur} \sim 88^\circ$, докато при пациент *B* само до $\theta_{ur} \sim 120^\circ$. Биохимията на урината регулира по същия начин промените в дебелината на покритието и след 120 min престой в пробите на пациенти *A* и *B*, дебелината на саждите намалява с $\Delta d \sim 16 \mu\text{m}$ и $\sim 3 \mu\text{m}$. Независимо от биохимичния състав на течността, химичният състав на покритието се откроява като още едно „основното средство“ за управление на преходите на омокряне, тъй като за дадена урина, повишеното окисление на саждите задейства ултрабързо (по отношение на данните до момента) омокряне за по-малко от 400 s (виж Фигура 8). Следователно, човешката урина влияе върху омокряемостта и дебелината на саждите по начин, много подобен на алкохолите.

За пълнота, слабо и силно окислените проби от сажди се подлагат на XPS анализ и по-късно се потапят в прясна урина за 240 минути с цел да се разбере степента, до която всяка биохимична компонента намалява концентрацията си в разтвора, т.е., след като се адсорбира/погълне от саждите. Фигура 9 и таблица 7 представят C1s фотоелектронни спектрални линии на покритията от сажди и биохимията на урината преди и след експериментите с потапяне. Очевидно, слабо окисленото покритие с квазиквадратна морфология на въглеродните частици/агломерати съдържа два пъти по-малко количество кислородни групи от слоя изграден от наночастици с квазисферична форма. Изглежда, че първото адсорбира/абсорбира протеинови молекули преференциално ($\sim 26\%$ намаление на съдържанието на протеин в сравнение с референтната проба),

докато покритието с квазисферична морфология взаимодейства предимно с урея (виж Таблица 7).



Фигура 9: C1s фотоелектронна спектрална линия на а) слабо окислени (квазиквадратни) и б) силно окислени (квазисферични) въглеродни сажди.

Таблица 7: Биохимия на човешка урина преди и след 240 min престой на слабо и силно окислени сажди в обема на течността.

Patient	Type of urine	pH	Protein (mmol/L)	Creatinine (mmol/L)	Uric acid (mmol/L)	Urea (mmol/L)
<i>A_4th probe</i>	fresh-reference probe	6	0.61	14.62	3.21	221.9
<i>A_4th probe</i>	fresh with weakly oxidized soot	6	0.44	14.49	3.24	218.4
<i>A_4th probe</i>	fresh with highly oxidized soot	6	0.61	14.69	3.08	207.6

4. Основни изводи от глава II

Глава II обхваща изцяло или частично съдържанието на статии J1 и J2 (вижте списъка с публикации, включени в докторската дисертация) и решава задача 1.

Убедително е доказан огромният потенциал на неомокреямата кварцова микровезна за приложимост в технологии за количествен анализ на човешки еякулати. Чрез отлагане на прясно отделена човешка семенна течност върху повърхността на сензора покрит със сажди, може да се различи съдържанието на PSA и семеногелини в семенната плазма, което зависи от честотата на еякулация. Показано е също така, че предложената сензорна конфигурация разпознава количествено характеристиките на човешкия еякулат (обем,

концентрация, вискозитет, коагулация и втечняване), където значителна част от резонансния отклик (~80%) се предизвиква от промени във вискозитета на семенната течност и разликите в нейната плътност, докато обемът и подвижността на сперматозоидите имат по-слаб ефект. По време на етапа на коагулация, вискоеластичността на течността е постоянна и квазиправа линия характеризира отклика на КМВ за даден период от време, като този период се променя от пациент до пациент и от измерване до измерване, разкривайки че покритият със сажди пиезорезонансен сензор може би е способен да регистрира "локални" модификации в биохимичния механизъм отговорен за образуването на коагулум.

Предложена и валидирана е неизвестна досега научна концепция за анализ на човешка урина с помощта на покрити със сажди пиезорезонансни устройства. Трансформирането на активната сензорна повърхност на набор от 5 MHz КМВ в свръххидрофобна позволява едновременно високочувствително разпознаване на няколко индикатора на човешка урина при потиснати нива на шум. Установено е, че първоначалният резонансен отклик и неговото развитие във времето зависят от съотношенията протеин/креатинин, протеин/пикочна киселина, протеин/урея и урея/креатинин, както и от химичния състав на саждите и рН на разтвора. Урината с най-високи съотношения на протеин/креатинин, протеин/пикочна киселина и протеин/урея проявява най-силна химическа реактивност спрямо саждите, генерирайки най-силен сензорен сигнал и най-бърз преход от неомокряемо към омокряемо състояние на твърдотелния интерфейс. Когато рН на разтвора е под изоелектричната точка, протеините придобиват нетен положителен заряд и лесно се привличат от киселинните групи на саждите, но при алкално рН и ниски концентрации на пикочна киселина афинитетът на свързване на креатинина се засилва поради повишеното привличане към хидрофобната повърхност. Забележимата разлика между електроотрицателността на кислородните и азотните атоми в саждите и молекулите на урея/креатинин (т.е. NH_2) предполага образуването на водородни връзки и дипол-диполни взаимодействия, променяйки процеса на абсорбция и съответния сензорен сигнал.

Основно предимство на неомокряемите кварцови микровезни е способността им да анализират количествено както човешка семенна течност, така и урина, което все още е непостижимо с всяко друго сензорно устройство описано в литературата и/или внедрено в индустрията.

ГЛАВА III: АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА СВРЪХХИДРОФОБНИ ПОКРИТИЯ ОТ ВЪГЛЕРОДНИ САЖДИ ПРИ СТАТИЧНИ И ДИНАМИЧНИ УСЛОВИЯ В СОЛЕНОВОДНИ БАСЕЙНИ

1. Мотивация

Моретата и океаните са жизненоважни за планетата Земя, тъй като влияят на климата, абсорбирайки слънчевата светлина и охлаждайки земната повърхност, разпределят топлината и влагата по земното кълбо, генерират кислород, балансират климатичните системи и осигуряват препитание на човечеството.

Съвременният и интензивен морски транспорт улеснява преноса на инвазивни водни микроорганизми, които могат да унищожат местната флора и фауна в дадена акватория или като минимум да влошат първоначалния хидродинамичен профил на плавателния съд поради образуването на неконфлуентен биофилм.

Несъмнено химически неполярните сажиди от рапично олио са ефикасно антимикробно средство, придаващо на твърдата повърхност много ниска повърхнинна свободна енергия и почти нулева налична енергия за биоадхезия, което предотвратява биофилмообразуването и намалява броя на захванатите биологични видове дори при частично компроментирана неомокряемост. Въз основа на този факт, наличието на повърхност без каквито и да било прилепнали бактерии може да се осъществи ако се вмъкнат сребърни съединения в структурната матрица на сажидите, тъй като положително заредените Ag^+ йони привличат отрицателно заредената клетъчна мембрана, разрушават протеините и генетичния код на бактериите, като по този начин блокират техния метаболизъм и размножаване, но загубата на Ag^+ наночастици поради механично износване е проблем. В допълнение, преобладаващата част от проучванията, насочени към антимикробни покрития, се извършват с единични бактериални щамове в микробиологични лаборатории и само незначителна до този момент част от изследванията се занимават с потапяне в открито море, където повърхността е подложена на подводни течения и колонизация от множество морски микроорганизми.

Следователно, намирането на начин за включване на сребърни наночастици в сажидите и изследване на механизмите им срещу биообрастване в морска вода, и след това сравняване на резултатите с тези получени чрез директно потапяне на ново поколение „тъканни сажиди“ в силно замърсено соленоводно блато, би било от огромно

значение за справяне с предизвикателствата, пред които са изправени специалистите участващи в опазването на околната среда, корабостроенето и морската промишленост.

2. Сажди от рапично олио легирани със сребро, като пасивно средство за борба с бактериалната пролиферация

2.1. Синтез и охарактеризиране на покрития от сажди легирани със сребро

Синтезът на легирани със сребро сажди е част от новите технологии за производство на механически устойчиви свръххидрофобни покрития от сажди. За целта, 100 mL чаша от температурно закалено стъкло се поставя върху пламъка на горящ хартиен фитил потопен в петриев съд пълен с рапично олио, разположен в конусовиден стоманен комин служещ като горивна камера. Кислородът необходим за поддържане на непрекъснато горене се доставя от компресор и се прехвърля към комина чрез шлауси, свързани към входа и изхода на разходомер/контролер (Fisher Scientific 11998014, Германия). Дебитът на въздуха е настроен на $0.0035 \text{ m}^3/\text{min}$, осигурявайки непълно изгаряне и утаяване на частици сажди по вътрешните стени на чашата. Приблизително 500 mg сажди се събират чрез деликатно изстъргване на стените след пет цикъла на опушване от 10 min и се съхраняват в стъклен флакон. Продължителността на всеки цикъл се определя от количеството рапично олио налично в камерата (~20 mL) и скоростта на неговото изпаряване.

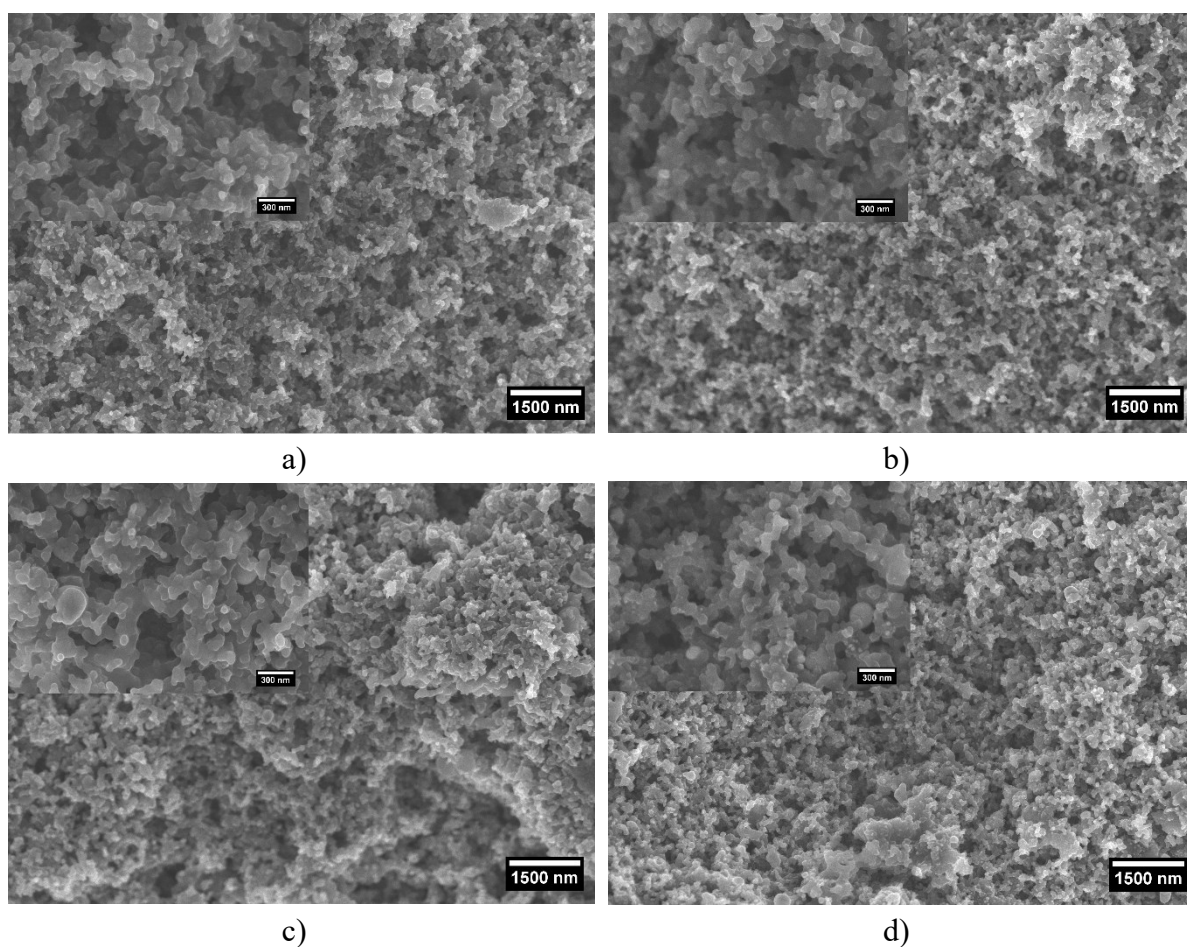
За получаване на суперхидрофобни покрития, събраните сажди се смесват с етанол и сребърен хидроген флуорид (AgHF_2) в съотношение ~1:100:0,2 об. % (500 mg-50 mL-100 mg). Влиянието на сребърните частици върху механичната здравина и антимикробната активност на саждите се оценява чрез увеличаване на количеството AgHF_2 в колоида до 200-400 mg. Тези пропорции сажди-алкохол- AgHF_2 са оптимални, тъй като по-ниското или по-високото съдържание на въглеродни наночастици води до повишена или понижена флуидност на разтвора, затруднено изпаряване на органичния разтворител, нееднородност на покритието или запушване на дюзата. Наличните колоидни разтвори се поставят един по един в пластмасов пулверизатор и се обработват с ултразвук в продължение на 40 минути за да се диспергират и разтворят остатъчните твърди частици. Покрития от сажди с постепенно нарастващи концентрации на сребро се отлагат спрейово върху три групи от две $12.5 \times 25 \text{ mm}$ стъклени подложки. Дюзата се поддържа наклонена на 45° спрямо хоризонталната равнина и нанасянето на слоя се извършва върху нагорещена плоча при 200°C , на разстояние от подложката до ~150 mm. И трите групи покрития се флуорират допълнително (Grangers Performance Proofer,

Grangers Ltd. UK), за да се подобри тяхната неомокряемост, докато четвърта група от два стъклени подложки се обработва спрейово с колоид без сребро и се отбелязва като контролен образец. Този подход осигурява четири различни вида покрития (общо осем проби), както е показано в таблица 8.

Таблица 8: Групиране на образците.

Group №	Sample №	Material
I	1	Fluorinated soot
	2	Fluorinated soot
II	3	Fluorinated soot+100 mg AgHF ₂
	4	Fluorinated soot+100 mg AgHF ₂
III	5	Fluorinated soot+200 mg AgHF ₂
	6	Fluorinated soot+200 mg AgHF ₂
IV	7	Fluorinated soot+400 mg AgHF ₂
	8	Fluorinated soot+400 mg AgHF ₂

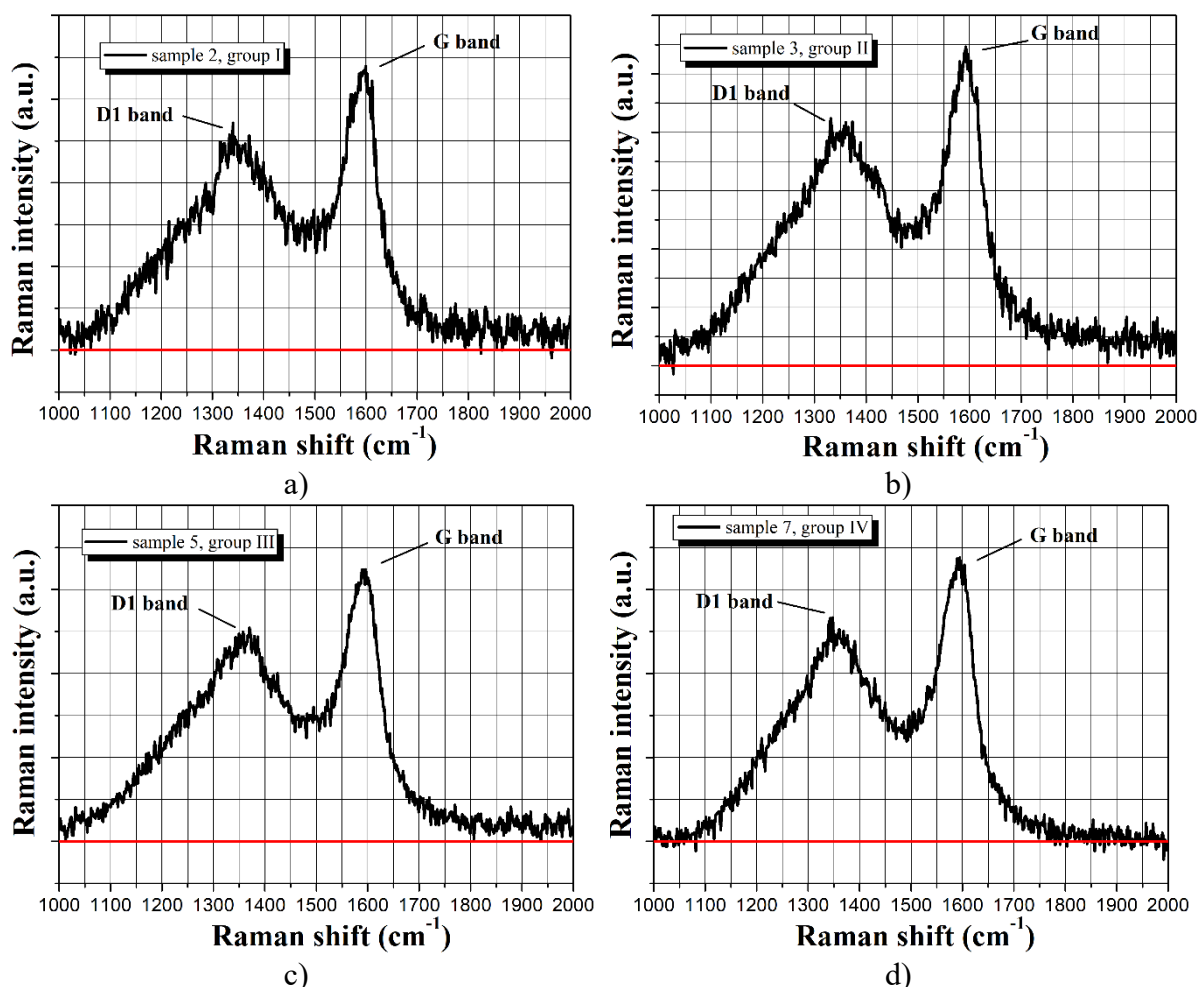
Морфологията на легираните със сребро сажди се изследва под сканиращ електронен микроскоп и получените изображения са илюстрирани на Фигура 10.



Фигура 10: Изображения от сканиращ електронен микроскоп на покрития от сажди а) без и със б) 100 mg AgHF₂, в) 200 mg AgHF₂ и г) 400 mg AgHF₂.

Може да се види, че саждите образуват фрагменти подобна мрежа, интегрираща плътно свързани и изцяло слети агломерати с квазиквадратна форма, идентични на тези получени при директен синтез от горящ пламък на рапично олио при скорост на въздушния поток от $0.0035 \text{ m}^3/\text{min}$. Наличието на AgHF_2 не влияе на физическия профил на покритията, което показва равномерно диспергирани и добре разтворени твърди частици.

Структурното охарактеризиране на тези хибридни сажки се извършва с помощта на Раманова спектроскопия, както е показано на Фигура 11.

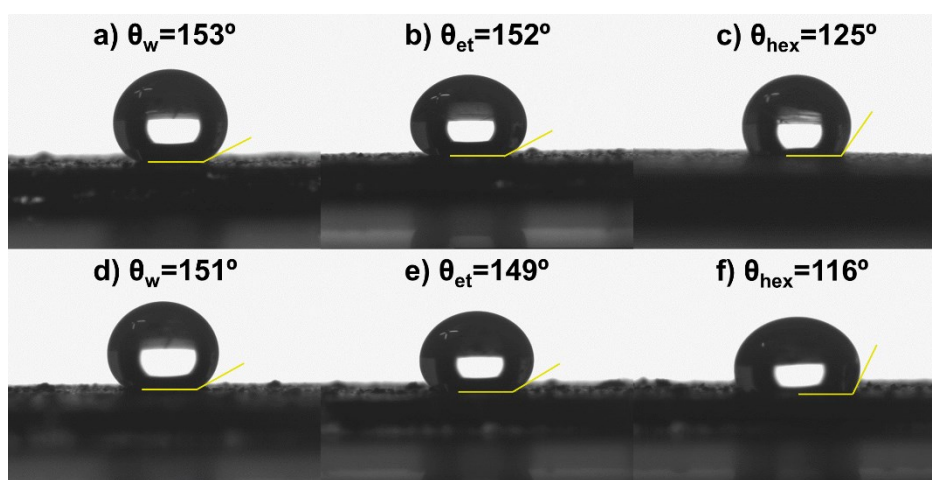


Фигура 11: Раманови спектри на покрития от сажки отложени от колоиден разтвор а) баз и със b) 100 mg AgHF_2 , c) 200 mg AgHF_2 and d) 400 mg AgHF_2 .

Рамановите спектри на легираните със сребро сажки се състоят от два основни пика, разположени при $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$ и $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$, отразяващи G-лента и D1-лента на неподреден графит. G-лентата съответства на режима на вибрация E_{2g} на идеално кристална графитна решетка, докато D1-лентата се среща единствено в неподредени структури, които активират режима на симетрия A_{1g} . В отлично съответствие с предишни

наблюдения, разработените покрития от сажиди имат графитоподобна аморфна структура с малко по-ниска степен на неподреденост в сравнение с квазисферичните сажиди. Не се наблюдава видимо разграничение между групите проби независимо от наличието или липсата на AgHF_2 и микрографичните изображения и Рамановите спектри са повтаряеми от проба към проба и група към група, което потвърждава надеждността на предложената техника на спрейово отлагане.

Повърхностната омокряемост на наноструктурите от сажиди се изследва посредством измерване на статичния контактен ъгъл, хистерезиса на контактния ъгъл и ъгъла на търкулване на 50 μL капчици от три вида течности (дейонизирана вода, етиленгликол, хексадекан), както е изобразено на Фигура 12.

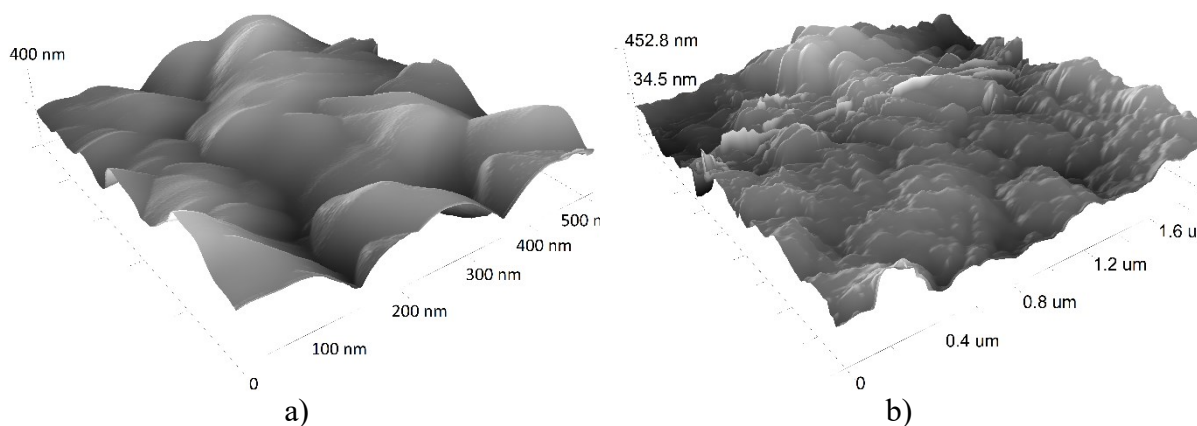


Фигура 12: Статичен контактен ъгъл (SCA) на 50 μL капки от дейонизирана вода (θ_w), етилен гликол (θ_{et}) и хексадекан (θ_{hex}), разположени върху покрития от сажиди отложени от колоиден разтвор a-c) без and d-f) с 400 mg AgHF_2 .

Базираният на перфлуоровъглерод/поливинилалкохол състав на флуорирания химикал придава амфифобен характер на пробите чрез създаване на тънка (~ 5 nm) флуорополимерна матрица върху покритията, което ги прави по-малко податливи на дисперсионни взаимодействия. Малкият хистерезис на контактния ъгъл (САН $\sim 1 \div 7^\circ$) и ъгълът на търкулване ($\sim 4 \div 7^\circ$) на капчици вода и етилен гликол потвърждават свръххидрофобността на повърхността („хлъзгаво“ състояние на Cassie-Baxter).

Това състояние се характеризира с формирането на т.нар. „водни мостове“ между отделните микро- нанограпавини поради присъщата хидрофобна природа на сажидите от рапично олио и тенденцията им да образуват грапав профил на повърхността, което се потвърждава от изчислената повърхнинна свободна енергия (γ_{sv}) и измерената на средна

квадратична грапавост (R_{rms}) на сажди със и без сребро, както е видно от Фигура 13. Съответно, $\gamma_{sv} \sim 1,47-1,55$ mN/m и $R_{rms} \sim 100-120$ nm, демонстрирайки материал с много ниска повърхнинна енергия и грапавост съизмерима с тази на другите видове сажди.



Фигура 13: 3-D снимки от силов атомен микроскоп на покрития от сажди отложени от колоиден разтвор а) без и б) с 400 mg AgHF₂.

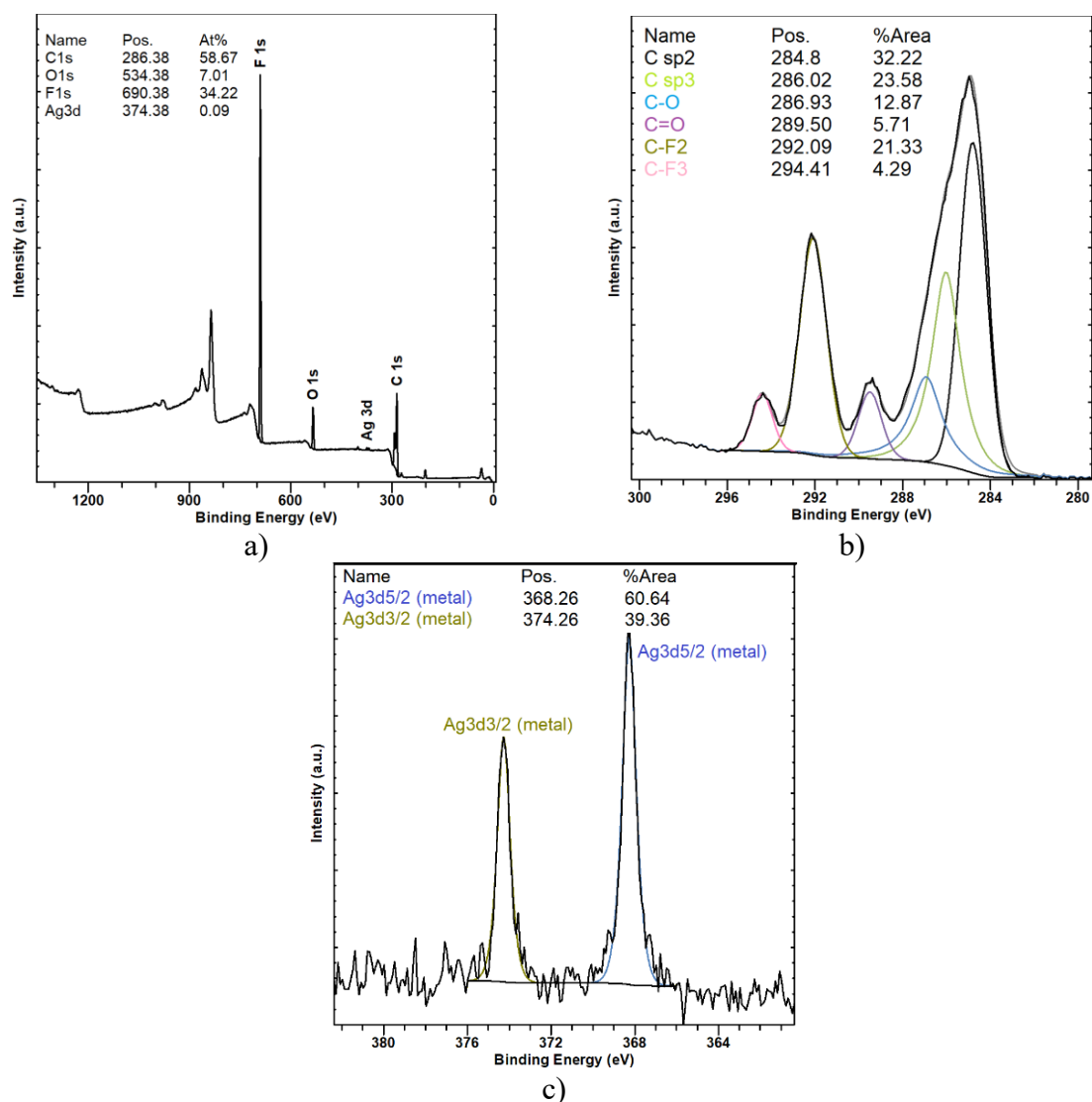
Неразделна част от изследването са елементният и химичен анализ на саждите легирани със сребро, обобщени в Таблица 9 и Фигура 14.

Таблица 9: Химичен състав на покрития от сажди със и без различни концентрации на сребро, определен в две области на повърхността чрез енергийна дисперсионна спектроскопия (EDS).

Group №	Chemical element (at. %)							
	C	C _{avg}	O	O _{avg}	F	F _{avg}	Ag	Ag _{avg}
I	93	93.1	5.5	5.45	1.5	1.45	0	0
	93.2		5.4		1.4		0	
II	83.5	83.05	5.5	5.75	9.3	9.4	1.7	1.8
	82.6		6		9.5		1.9	
III	89.6	89.8	5.1	4.75	3.3	3.5	2	1.95
	90		4.4		3.7		1.9	
IV	81.7	81.55	5.9	6.1	6.1	6.25	6.3	6.1

Енергийно-дисперсионната спектроскопия (EDS) разкрива, че покритията от сажди легирано със сребро са съставено основно от въглерод, съпътстван от кислород, флуор и сребро, свързани с процесите на окисляване, флуориране и модификация със AgHF₂. Числовите стойности в таблица 9 показват еднороден химичен състав на саждите с най-голямо отклонение в рамките на ± 0.5 at. %. XPS профилите на Фигура 14 предоставят ценна информация за възникващите химични връзки по време на спрейово отлагане на колоидната смес от сажди, алкохол и AgHF₂. Последният е химично съединение от

семе́йството на сребърните флуориди, притежаващо висока разтворимост в органични разтворители и формиращо перфлуороалкилни свободни радикали при термохимично разлагане. Пръскането на колоида върху стъклена подложка нагрята до 200 °C предизвиква образуването на органометално съединение на основата на перфлуороалкилно сребро, ясно забележимо от характерните спин-орбитални компоненти $\text{Ag}3d_{5/2}$ и $\text{Ag}3d_{3/2}$ на металното сребро (виж Фигура 14c). Вторичното флуориране създава ковалентно свързан флуорополимерен филм чрез 5 C-F₂ връзки на всяка C-F₃ връзка, като основната разлика между XPS спектрите на легирани със сребро и без сребро сажди е липса на Ag3d пикове в последния.

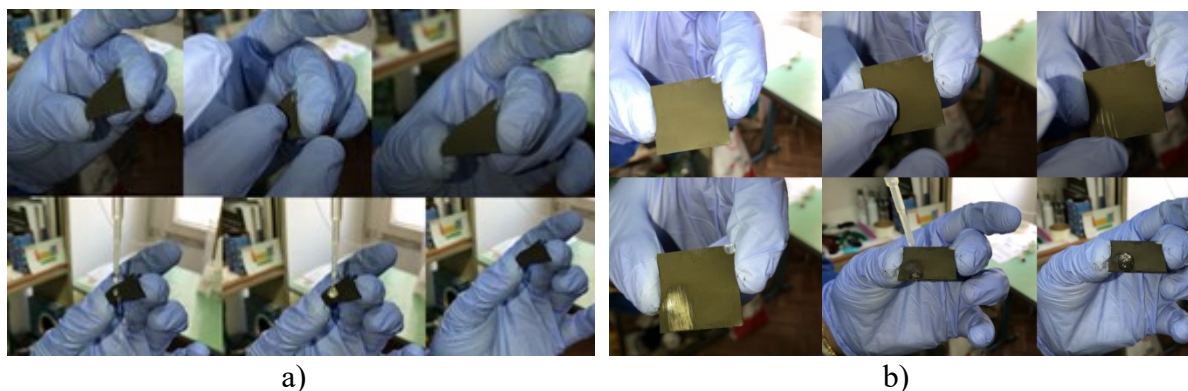


Фигура 14: XPS а) обобщен спектър, б) C 1s и в) Ag3d фотоелектронни спектрални линии на сажди легирани със сребро при спрейово отлагане от колоид съдържащ 400 mg AgHF₂.

2.2. Механична якост на покритията от сажди легирани със сребро

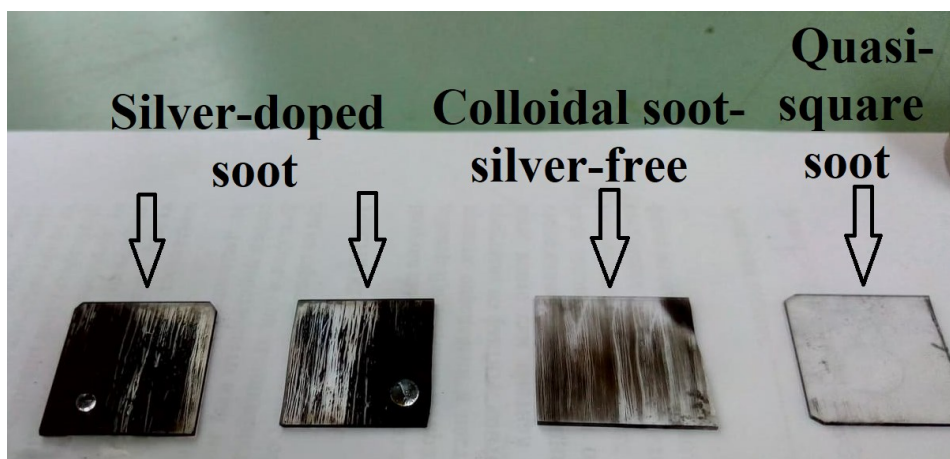
За да се оцени стабилността, повърхнинната адхезия и издръжливостта под вода на легираните със сребро сажди, покритието се подлага на третиране с пръсти и шкурка, като резултатът се сравнява със саждите с квазиквадратна морфология и вродена механична устойчивост под вода, като по този начин се установява количествено въздействието на AgHF_2 върху износоустойчивостта на слоя. Саждите се третират ръчно напред-назад върху повърхността на шкурка P1200 при приложено натоварване от 100 g. Повърхнинната адхезия на квазисферични, квазиквадратни и легирани със сребро сажди се сравнява чрез стандартен ASTM D3359 метод за измерване на адхезия чрез тест с адхезивна лента. Като отделен експеримент, покритието от сажди легирани със сребро се подлага на високоскоростна водна струя ($\sim 25 \text{ m/s}$). Не на последно място, изтъркване с пръсти се прилага върху саждите легирани със сребро след антимикуробните експерименти с морска вода за оценка на дълготрайността на разработеното свръххидрофобно покритие.

Износоустойчивостта на наноструктурите от сажди съдържащи AgHF_2 се повишава независимо от концентрацията на сребро, за разлика от тези несъдържащите сребро и с характеризиращи се с типичната квазиквадратна форма, които не издържат на механично триене и са напълно разслоени, както е показано на фигури 15-16.

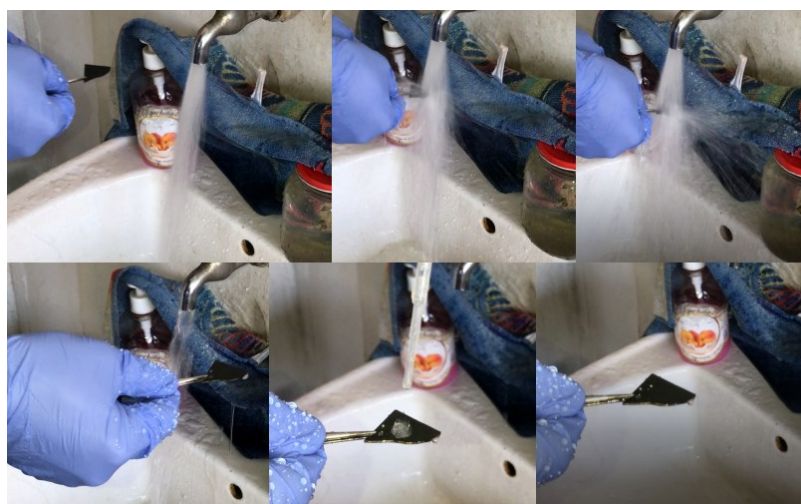


Фигура 15: Изтъркване с пръсти на а) сажди легирани със сребро и б) квазиквадратни сажди отложени директно от горящ пламък.

Безспорно, шкурката частично разслаява легираните със сребро сажди след 150 cm дължина на абразия, но въпреки всичко, тези хибридни сажди остават непокътнати и свръххидрофобни ($\text{SCA} \sim 150^\circ$, $\text{CAN} \sim 4^\circ$ и ъгъл на търкулване 11°) при пет-шест секундно третиране с високоскоростна водна струя, както е показано на Фигура 17 – ефект, който непостиган до този момент с други подсилващи химични агенти като алкохол-флуоровъглерод или полидиметилсилоксан.



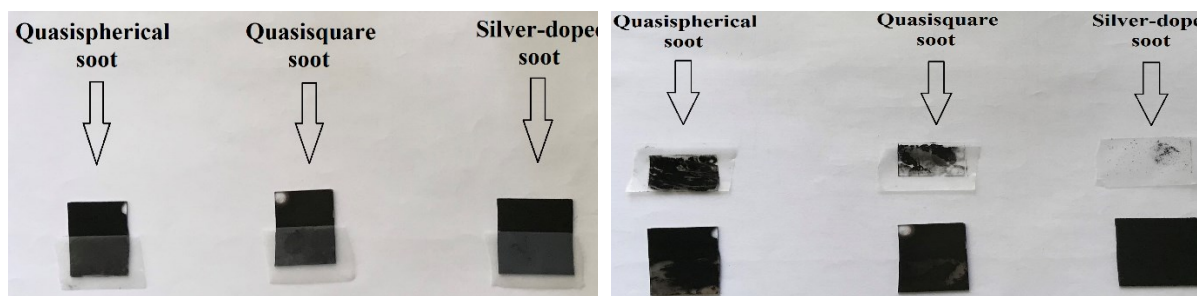
Фигура 16: Износоустойчивост на покрития от различни видове сажди след абразивен тест с шкурка тип P1200.



Фигура 17: Механична устойчивост на покритие от сажди легирани със сребро при третиране с високоскоростна водна струя.

Нещо повече, легираните със сребро сажди принадлежат към материалите с адхезивен клас 4В, където по-малко от 5% от повърхността се отстранява, съгласно Фигура 18, и независимо от третирането с шкурка, приблизително 50-75% от повърхността остава неомокряема (виж Фигура 16). Вероятно появата на свободни перфлуороалкилни радикали по време на термохимичното разлагане на AgHF_2 , при пръскане на колоида върху нагрята до $200\text{ }^\circ\text{C}$ стъклена подложка, заздравява саждите. Добре известно е, че такива радикали стабилизират и укрепват С-Аg връзките и може би осигуряват изключителна стабилност на фракталоподобната мрежа от сажди, както е описано за сребърни наночастици вклинени в порести въглеродни подложки. Не на последно място, С-Ф връзките са едни от най-здравите в органичната химия, което може допълнително да влияе на устойчивостта на покритието към външни въздействия. Като се има предвид и относително добрата дългосрочна стабилност на тези сажди, те се

открояват като мащабируем материал със силен потенциал за „реални“ изследвания във водни басейни.



Фигура 18: Повършинна адхезия на квазисферични, квазиквадратни и легирани със сребро покрития от сажди.

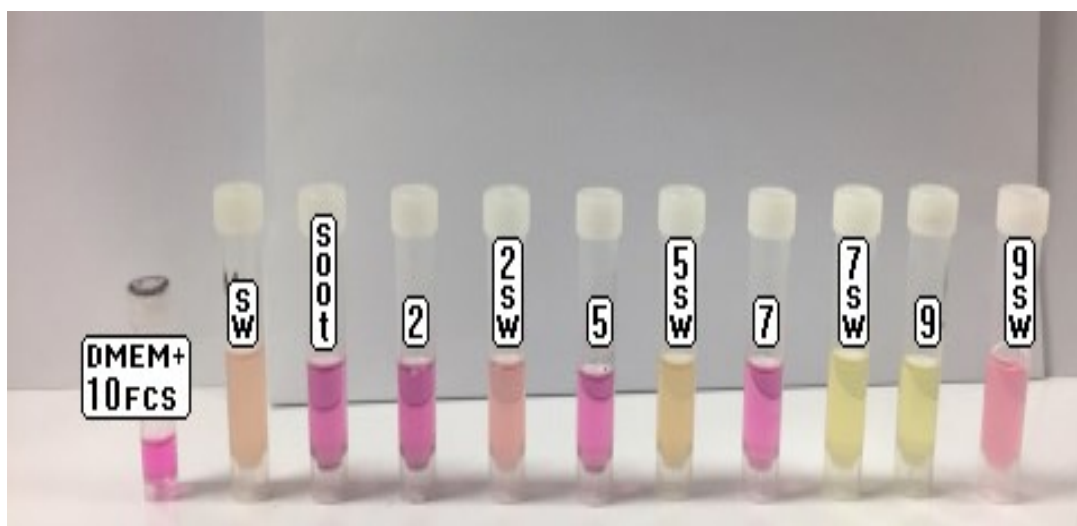
2.3. Антимикробно действие на легираните със сребро покрития от сажди след 105 дневен престой в морска вода

Антимикробната активност на всяка група проби (виж таблица 8) се оценява след продължителен сто и петдневен престой в морска вода (5 юли – 17 октомври 2018 г.). Последната е взета от северната част на Черноморското крайбрежие (Варна, България), тъй като биохимията на морската вода в този регион благоприятства развитието на морската биота и различни бактерии.

В края на тестовия период, клетъчната адхезия и биофилмообразуването се оценяват чрез микробиологичен анализ, според който 2 mL от всяка течна проба (морска вода, съдържаща непокрита и покрити със сажди стъклени предметни стъкла) се центрофугират и фината утайка се ресуспендира в 0.2 mL надутайка. Успоредно с това непокритите и покрити със сажди се поставят в ламинарен бокс и около 1 cm² от повърхността им се изстъргва внимателно и се ресуспендира в 0.2 mL дестилирана вода. Всички проби (морска вода и изстърган материал) се посяват както в петриев панички с кръвен агар, така и в стерилни епруветки съдържащи 1 mL хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12, допълнена с 10 % фетален телешки серум и pH индикатор червен фенол (DMEM/F12+10 % FCS), и се поставят в инкубатор при ~37 °C и CO₂ ~5%. Категорията на бактериалните щамове се определя след 48 часа инкубация, като се използва диференциална техника за оцветяване по Грам, докато биологичните видове се идентифицират с BBL™ Crystal™ система за идентификация. CFU/mL се определя чрез измерване на оптичната плътност (OD) на DMEM/F12+10% FCS суспензии със спектрофотометър Multimode Detector DTX 880 (Beckman Coulter, USA) при λ=595 nm и преброяване на клетките. Основните изводи относно антимикробното действие на

саждите се извличат чрез съпоставяне на началната и крайната оптична плътност, киселинността и броя CFU/mL на всяка суспензия.

Системата за идентификация разпознава четири Грам-отрицателни бактериални щама като *Acinetobacter Iwoffii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevundimonas diminuta* и *Brevundimonas vesicularis*. Тези бактерии живеят и се размножават заедно с други видове в самоорганизиращи се общности и отделят органични киселини, които повишават киселинността на хранителната среда. На свой ред цветът ѝ се преобразува от ярко розово (pH ~8,2) в оранжево-червено или жълто (pH ~7,2-6), установявайки корелация между началната и крайната киселинност, OD и броя на CFU/mL, както е видно от фигура 19 и таблица 10.



Фигура 19: Изменения в киселинността (pH) на хранителна среда DMEM/F12+10% FCS след 48ч инкубация. Номенклатура: **DMEM/F12+10 %FCS** – контролна проба от чиста хранителна среда; **SW** – контролна проба от 105 дневна морска вода; **Soot** – контролна проба на наночастици от сажди; **2, 5, 7** – твърдотелна материя изстъргана от образци 2, 5 и 7 (виж Таблица 8); **2SW, 5SW, 7SW** – 105 дневна морска вода съдържа в себе си образци 2, 5 и 7; **9** – твърдотелна материя изстъргана от непокрито стъкло; **9SW** – 105 дневна морска вода съдържа в себе си непокрито стъкло.

Чистата хранителна среда не съдържа бактерии, но морската вода насърчава клетъчната пролиферация ($\sim 2 \times 10^7$ CFU/mL в разтвора) в съответствие с биохимията на Черно море. Учудващо, никакви клетки не са прикрепени към всички видове изследвани сажди и хранителната среда пълна с тях не съдържа никакви бактерии (виж Таблица 10). Стъклото без покритие, от друга страна, е добра среда за пролиферация на микроорганизми, което води до най-голямо количество натрупани бактерии (5×10^8

CFU/mL). Всички разтвори на морска вода, в които са били потопени покритите и непокрите със сажди стъклени подложки издават наличието на жива материя.

Таблица 10: Числови стойности на оптичната плътност (OD), pH and CFU/mL след 48ч инкубация.

Object of microbiological analysis	Initial OD	OD after 48h	Initial pH	pH after 48h	CFU/mL
DMEM/F12	0.046	0.046	8.3	8.3	0
SW	0.046	0.392	8.3	6.5	2×10^7
soot	0.046	0.044	8.3	8.3	0
2	0.046	0.046	8.3	8.2	0
5	0.046	0.046	8.3	8.1	0
7	0.046	0.046	8.3	8.1	0
9	0.046	0.811	8.3	5.8	5×10^8
2SW	0.046	0.092	8.3	7.2	2×10^6
5SW	0.046	0.201	8.3	6.8	1×10^7
7SW	0.046	0.594	8.3	6.2	4×10^7
9SW	0.046	0.151	8.3	6.9	5×10^6

Антибиоадхезинните свойства на покритията от сажди легирани със сребро е синергичен ефект от неомокряемостта на повърхността и наличието на Ag^+ йони. Среброто действа като антимикробен агент и предотвратява бактериалната адхезия, докато живата материя благоприятно се размножава в обема на морската вода и изненадващо, CFU/mL се увеличава в зависимост от концентрацията на AgHF_2 . Това противоречи на един от основните антибактериални механизми на сребърните наночастици, а именно йонна деактивация, според който увеличеният брой Ag^+ йони в разтвора предполага по-нисък процент на растящи микроорганизми. Трябва да се има предвид обаче, че в случая сребърните наночастици са здраво вградени в саждите чрез С-Аг връзки, поради което нарастващата концентрация на сребро възпира пролиферацията на бактериите върху слоя и те се локализируют в обема на течността.

3. Антимикробна активност на покрития от въглеродни сажди потопени в соленоводно блато

3.1. Избор на покрития от сажди и географско местоположение на района

Контролираното горене на рапично олио гарантира производството на различни видове покрития от сажди, но най-подходящи за сравнителни експерименти на открито са тези, съставени от слабо окислени въглеродни агломерати с квазиквадратна форма, функционализирани с алкохол и флуоровъглерод или приготвени чрез комбиниране на

текстилни продукти, канаколит и перфлуорирани химикали (т.нар. тъканни сажди). Това е така, тъй като специфичната химическа модификация на първичните сажди води до създаването на два вида покрития със съвсем различен физикохимичен профил.

Преди провеждане на експериментите, квазиквадратните сажди се отлагат върху половината от повърхността на единична полирана желязна подложка с размери 25×50 mm, която допълнително се третира с алкохол и флуоровъглерод, обозначена като образец 1, докато горната част на друга желязна подложка се покрива с тъканни сажди, обозначени като образец 2. След това двата проби се потапят за седем дни (6-13 август 2022 г.) в блато със солена вода, със средна температура от 25 °C през лятото при ежедневни колебания на температурата на въздуха в рамките 15-35 °C. Блатото се намира на няколко метра от морския бряг на курорта Олимпиакос Акти, община Катерини, провинция Източна Пиера, Гърция. Тази акватория се счита за част от Олимпийската ривиера, Егейско море, и се смята за подходяща за пролиферацията на повече от шестдесет вредни водорасли, влошаващи морската биота и качеството на водата, както е загатнато на фигура 20.

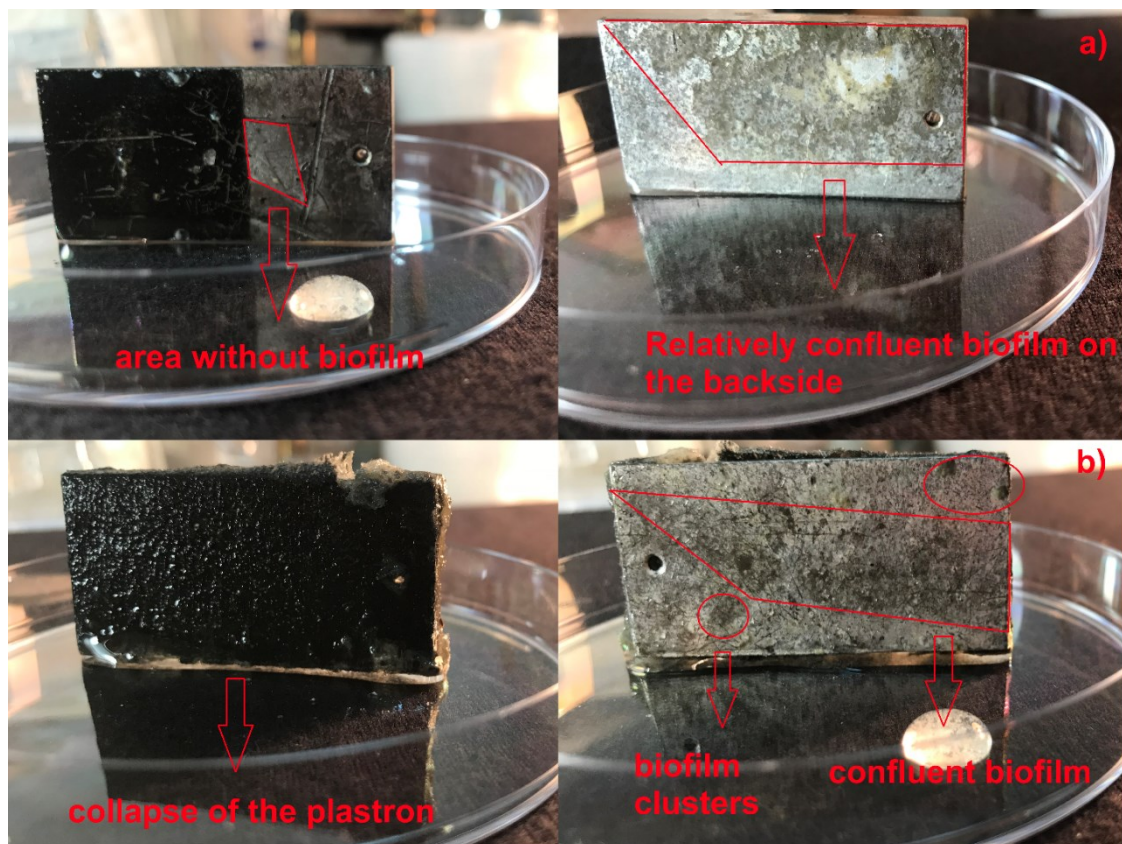


Фигура 20: Снимка на флората и фауната в блатото, както и разположението на образците. Номенклатура: *sample1* – желязна подложка, чиято горна повърхност е наполовина покрита със сажди обработени с алкохол и флуоровъглерод; *sample2* – тъканни сажди отложени върху желязна подложка.

3.2. Резултати от изследванията

След седемдневния престой в блатото, двата образца се поставят в две стерилни пластмасови шишенца с блатна вода и след тридесет дни пробите се обработват по начина описан в раздел 2.3 на тази глава. Отделно, биологичен материал от всяка проба се посява в стерилни съдове съдържащи селективни среди за микробен растеж (*Candida Colorex*, *Sabouraud agar*, *Orientation agar Colorex*, *MacConkey agar* and *Columbia blood agar*), след което се инкубира за 72 часа.

Няколко интересни резултата се установяват в края на тестовия период (общо 37 дни), както е илюстрирано на фигура 21.

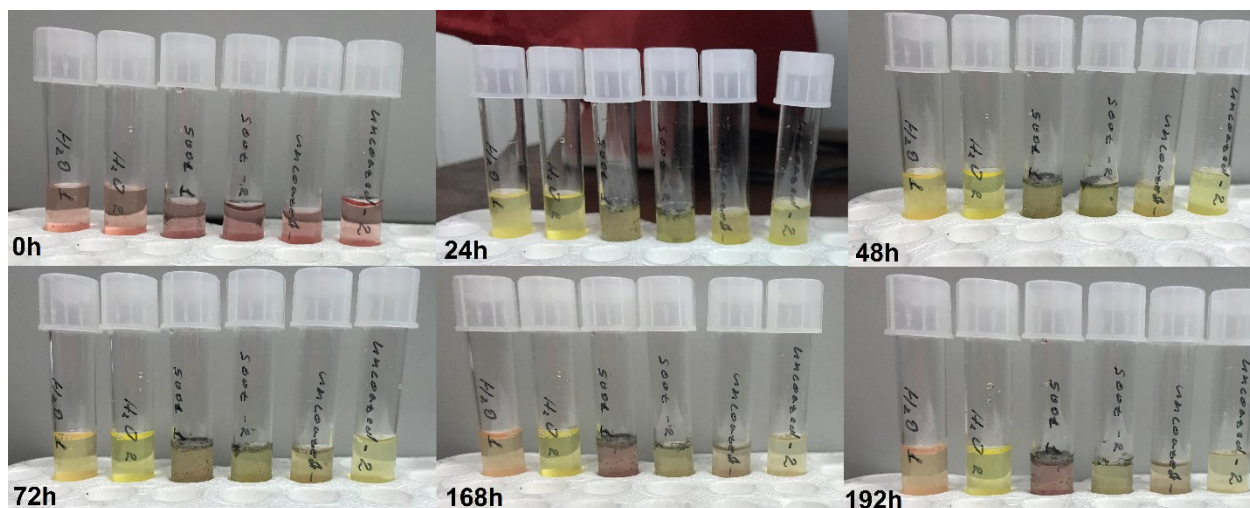


Фигура 21: Предна и задна част на железните подложки покрити със а) сажди модифицирани с алкохол и флуоровъглерод (образец 1) и б) свръхизносоустойчиви тъканни сажди (образец 2) след приключване на изследванията.

Може да се види, че и двете покрития от сажди са непокътнати, но захванатият между грапавините въздух вече изчерпан и повърхността е напълно напоена с блатна вода, което поставя въпроса дали антимикробните свойства на саждите са компрометирани. Освен това, задната страна на железните подложки е покрита с визуално различим макроскопичен биофилм, но върху пробата с тъканни сажди биофилмът не е конфлуентен и се забелязват отделни клъстери от микроорганизми върху непокритата част. Област без биофилм се наблюдава на границата образец1-метал (виж Фигура 21a), което предполага, че този наноматериал контролира кинетиката на биофилмообразуване независимо от влошената неомокреваемост.

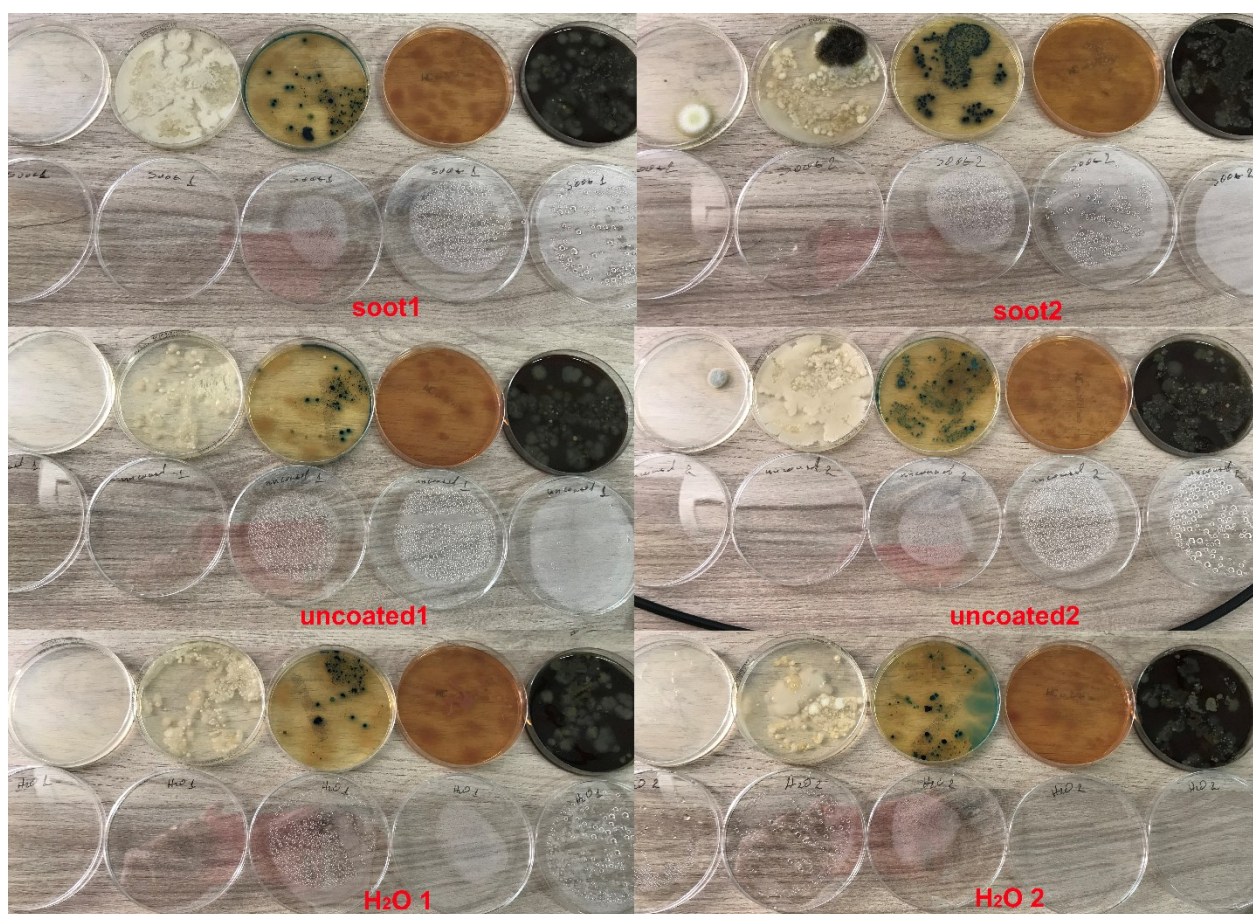
За да се провери това твърдение, промяната в цвета на различни бактериални суспензии се проследява за период от 192 часа, както е показано на фигура 22. В рамките на първите 24 часа всички суспензии стават жълти, но тези съдържащи наночастици от сажди са по-тъмни, т.е. характеризират се с по-високо рН и по-малък брой живи

бактерии. При продължителна инкубация кюветата маркирана като *soot1* възстановява розовия си цвят (виж Фигура 22), което предполага бактерициден ефект на химически модифицираните сажди с квазиквадратна морфология. Може да се твърди, че възстановяването на цвета е причинено от промени във формата на клетките, натрупване на извънклетъчни артефакти и секреция на амоняк, но ако тази хипотеза е вярна, тогава възстановяването на цвета трябва да бъде видимо във всички проби. Очевидно лека вариация се забелязва само в кюветата с *H₂O1*, вероятно поради изтичане на ултрафини квазиквадратни агрегати от сажди във водата и елиминация на някои от бактериите през времеви интервал на статичните анализи, което е невъзможно при свръхизносоустойчивите тъканни сажди (високата механична якост не позволява утаяване на наночастици в разтвора). Въпреки че твърдението за вероятни бактерицидни свойства на квазиквадратните агломерати от сажди е спекулативно до известна степен, то се поддържа от нови открития на други изследователски групи по света, според които вмъкването на различни видове наночастици от сажди в биологични суспензии причинява смъртта на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактериални щамове като *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.



Фигура 22: Изменения в pH на DMEM бактериални суспензии след 192 часова инкубация. Номенклатура: *soot1* – наночастици от сажди обработени с алкохол и флуоровъглерод заедно с бактерии изстъргани от образец 1; *uncoated1* – бактерии изстъргани от непокритата част на образец 1; *soot2* – тъканни сажди и бактерии изстъргани от образец 2; *uncoated2* – бактерии изстъргани от непокритата част на образец 2; *H₂O1* – блатна вода от съда, в който е поставен образец 1; *H₂O2* – блатна вода от съда, в който е поставен образец 2.

От практическо значение е да се разбере вида на бактериалните щамове развили се върху потопените подложки или преобладаващи предимно в околната солена вода, което е постижимо чрез анализиране на клетъчните колонии, изобразени на Фигура 23. Пет патогенни Грам-отрицателни (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei* и *Escherichia coli*) и три Грам-положителни (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus pneumoniae*) бактерии, заедно с една грам-положителна гъбичка (*Candida albicans*), са идентифицирани в агарните среди.



Фигура 23: Разпределение на различни бактериални и гъбични щамове в селективните растежни среди. Номенклатура: *soot1* – наночастици от сажди обработени с алкохол и флуоровъглерод заедно с бактерии изстъргани от образец 1; *uncoated1* – бактерии изстъргани от непокритата част на образец 1; *soot2* – тъканни сажди и бактерии изстъргани от образец 2; *uncoated2* – бактерии изстъргани от непокритата част на образец 2; *H₂O1* – блатна вода от съда, в който е поставен образец 1; *H₂O2* – блатна вода от съда, в който е поставен образец 2.

Клетките са неравномерно разпределени в растежните среди, разкривайки тенденция в микробната пролиферация от проба към проба. Например, *Streptococcus pneumoniae* се

размножава по-бързо върху партидите отнасящи се до квазиквадратните сажди (т.е. *soot1*, *uncoated1* и *H₂O1*), докато *Shigella sonnei* и *Escherichia coli* растат предимно върху партидите свързани с тъканните (т.е. *soot2*, *uncoated2*, *H₂O2*). За да се анализират тенденции на бактериален растеж, експерименталните данни свързани с броя на CFU/mL и pH на средата са събрани в Таблица 11.

Таблица 11: Брой колонии образуващи единици CFU/mL като функция на вида образец и pH на средата. Синьото и червено оцветяване съответстват на отрицателни или положителни ефекти на саждите спрямо бактериалната пролиферация. Знаците (+) и (-) отразяват Грам-положителната и Грам-отрицателна класификация.

Bacterial strain/Fungus	Type of sample											
	<i>H₂O1</i>		<i>H₂O2</i>		<i>Soot 1</i>		<i>Soot 2</i>		<i>Uncoated1</i>		<i>Uncoated2</i>	
	pH	CFU /mL	pH	CFU /mL	pH	CFU /mL	pH	CFU /mL	pH	CFU /mL	pH	CFU /mL
<i>Candida alb.</i> (+)		3×10 ⁵		4×10 ⁵		1×10 ⁵		3×10 ⁵		4×10 ⁵		4×10 ⁵
<i>Staphyl. Aureus</i> (+)		2×10 ⁵		2×10 ⁵		5×10 ⁵		1×10 ⁵		3×10 ⁵		5×10 ⁵
<i>Pseudomonas</i> (-)		2×10 ⁵		6×10 ⁵		1×10 ⁵		3×10 ⁵		3×10 ⁵		3×10 ⁵
<i>Proteus vulgaris</i> (-)		2×10 ⁵		5×10 ⁵		2×10 ⁵		4×10 ⁵		2×10 ⁵		3×10 ⁵
<i>Enter. Faecalis</i> (+)	6.7	1×10 ⁵	6	3×10 ⁵	7	1×10 ⁵	6.4	4×10 ⁵	6.5	1×10 ⁵	6.2	3×10 ⁵
<i>Enterobac. Aerog.</i> (-)		3×10 ⁵		3×10 ⁵		3×10 ⁵		3×10 ⁵		1×10 ⁵		1×10 ⁵
<i>Shigella sonnei</i> (-)		1×10 ⁵		1×10 ⁵		0		2×10 ⁵		0		3×10 ⁵
<i>Str. Pneumoniae</i> (+)		4×10 ⁵		3×10 ⁵		4×10 ⁵		1×10 ⁵		6×10 ⁵		2×10 ⁵
<i>E. coli</i> (-)		2×10 ⁵		3×10 ⁵		1×10 ⁵		3×10 ⁵		2×10 ⁵		4×10 ⁵
Total CFU/mL		2×10 ⁶		3×10 ⁶		1.8×10 ⁶		2.4×10 ⁶		2.2×10 ⁶		2.8×10 ⁶

Данните разкриват, че саждите с квазиквадратна морфология потискат предимно размножаването на Грам-отрицателни бактерии, като този наноматериал придава бактериостатични свойства на цялата околна среда (т.е. на непокритата част и самата блатна вода). Тъканните сажди пък ускоряват пролиферацията на тези бактерии, но възпрепятстват размножаването на част от Грам-положителните щамове. Независимо от всичко, двата образца от сажди имат по-малък брой полепнали по повърхността клетки в сравнение със задната част на железните подложки, демонстрирайки потенциал за антимикробни приложения в реална среда, дори при загуба на неомокреваемост.

4. Основни изводи от глава III

Глава III обхваща изцяло или частично съдържанието на статии J3 и J4 (вижте списъка с публикации, включени в докторската дисертация) и решава задача 2.

Включването на сребърни наночастици в силно неподредената фрагментална структура на саждите придава механична устойчивост на свръххидрофобните покрития

и предизвиква синергичен антимикробен ефект. Големите разстояния между твърдата повърхност и бактериалните клетки, обусловени от изпъкналия менискус на течността поради водоотблъскващия интерфейс, активират единствено силите на привличане на далечни разстояния, увеличават кинетичната бариера, която бактериите трябва да преодолеят, за да достигнат повърхността и правят биоадхезията обратима, докато сребърните йони проникват през отрицателно заредената клетъчна мембрана, унищожават протеините и генетичния код на бактериалните щамове, блокират техния метаболизъм и размножаване.

В случай, че покритието загуби неомокряемите си свойства, поради разтваряне на захванатия въздушен слой в заобикалящата вода, избраните моделни сажди продължават да поддържат бактериостатична и бактерицидна активност дори в отсъствието на AgHF_2 , което се обяснява от гледна точка на предизвикания оксидативен стрес от хидроксилните функционални групи на саждите, деактивация на щамове чрез подбуждане на протеолитично разграждане, увреждане на ДНК и геномна нестабилност. Образуването на амониеви молекули около клетките, чрез водородно свързване между основните и киселинните центрове на саждите и азотът натрупан около живата материя, е допълнителен механизъм против биообрастване, който е ефективен предимно при Грам-отрицателни бактерии, очертавайки големият потенциал на саждите от рапично олио да контролират пролиферацията на живи клетки в растежна среда, превръщайки се в евтин терапевтичен агент.

Въпреки че ефективността на саждите срещу биообрастване зависи от техния физикохимичен профил, възпрепятстваната пролиферация на повече от петнадесет различни микроорганизми е добра отправна точка за лансирането на рационализирани стратегии против биозамърсяване. Например, базирани на хидрофобни бои обогатени със сажди, което изглежда много реалистичен вариант спомагащ за трайно решаване на проблемите с биозамърсяването на корпусите на корабите и разпространението на микробни инфекции.

ГЛАВА IV: ЛЕДОФОБНИ САЖДИ ОТ РАПИЧНО ОЛИО КАТО ИНСТРУМЕНТ ЗА КОНТРОЛ НА ЛЕДООБРАЗУВАНЕТО ПРИ ТЕЖКИ КЛИМАТИЧНИ УСЛОВИЯ

1. Мотивация

Атмосферното и кондензационно обледеняване са нежелани природни явления с много тежки последици за международния въздушен транспорт, автомобилния трафик, системите за зелена енергия, автономното производство на електроенергия с помощта на фотоволтаични клетки и правилната експлоатация на находищата на газ и нефт в арктическите региони.

Стратегията за пасивна защита от обледеняване на гражданската инфраструктура чрез свръххидрофобни повърхности (покрития) е наистина много привлекателна, тъй като не е енергоемка и следователно е икономически целесъобразна. Елиминирането на опустошителните последици от ледена буря върху различни промишлени съоръжения, изработвайки външните им части водоотблъскващи, става все по-популярно. В условия на минусови температури и висока влажност, обаче, това изглежда невъзможно поради кондензационното замръзване на водни пари върху неомокряемото покритие, което възпрепятства отскачането на блъскащата се в повърхността свръхохладена капка и ускорява ледената нуклеация. Следователно, един основен въпрос търси своя отговор, а именно, *има ли начин да се наблюдава отскок на капчици върху заскрежена повърхност или ледофобността на свръххидрофобните материали при динамичен сблъсък със свръхохладени капки се запазва само в отсъствие на скреж?*

Известно е, че кондензационното обледеняване върху сажди от рапично олио може да бъде потиснато чрез намаляване на количеството хидрофилни активни центрове на повърхността, което да забави образуването на „ледени мостове“ между кондензатите и скоростта на разпространение на заскрежаващата вълна. Крехкостта на първичните (необработени) въглеродни наночастици е пречка, която се заобикаля чрез подсилване на наноструктурите със свързващи агенти, чийто ефект върху противообледеняващите свойства на саждите не е изучен. Дали повърхността покрита със сажди може да бъде проектирана така, че да осигури необходимата здравина и да потисне фазовите преходи от газообразно към течно и твърдо агрегатно състояние на водата е дискуссионен въпрос. Не е ясно и как това ще промени динамиката на взаимодействие с удрящите се в повърхността водни капки, тъй като не е изяснено докрай кои физикохимични параметри на саждите влияят на процеса на замръзване. Физичните основи на

обледеняването върху свръххидрофобни сажди не са изяснени, тъй като механизмите на топлообмен в този материал не са изследвани и няма надежден метод за наблюдение и тълкуване на фазовите преходи. В момента тези недостатъци ограничават практическата приложимост на ледофобните сажди от рапично олио.

2. Кондензационно обледеняване на химически модифицирани неомокреми покрития от въглеродни сажди

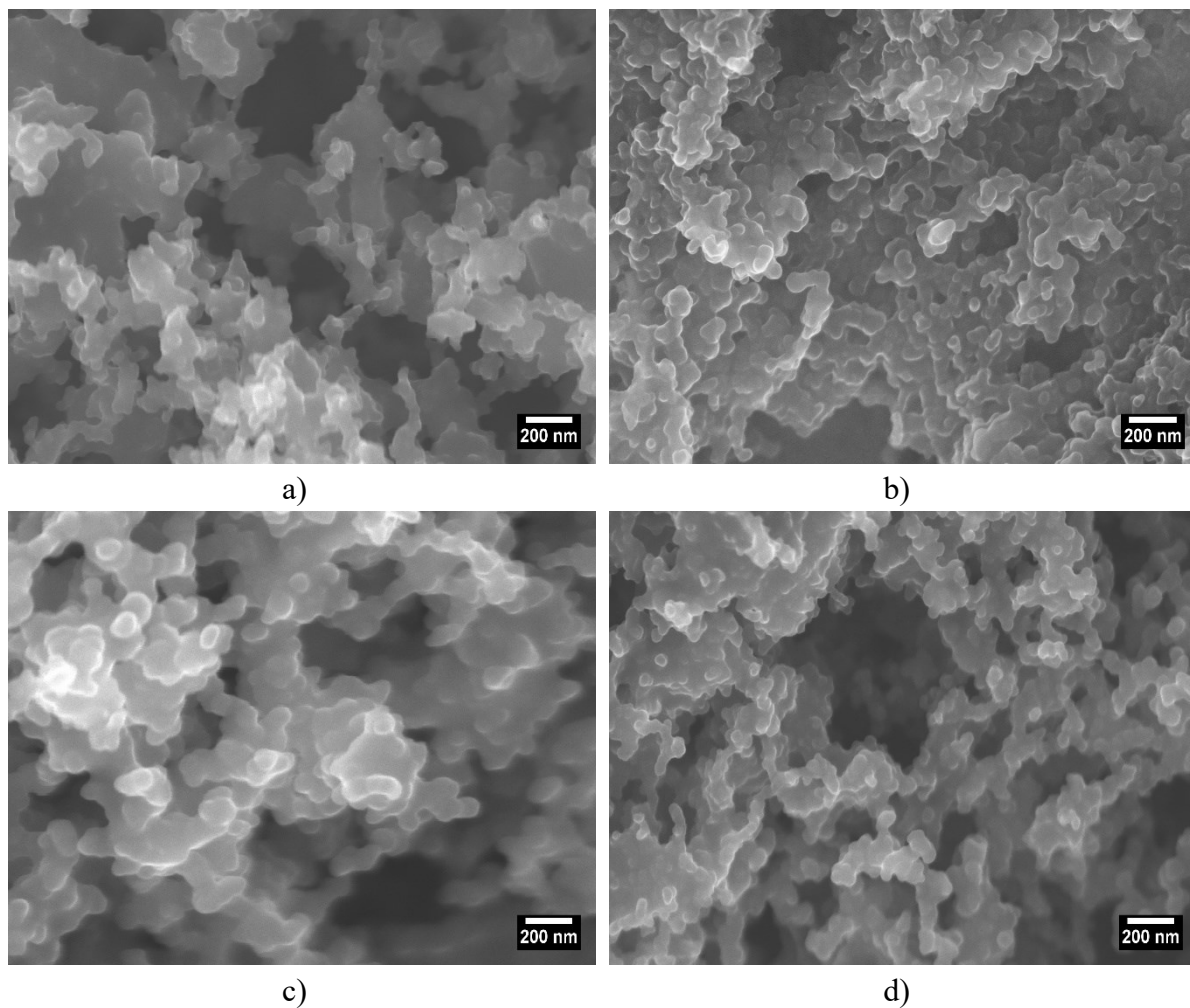
2.1. Отлагане и охарактеризиране на покритията

Отлагането на сажди се извършва при контролирано горене на рапично олио, като четири стъклени подложки с размери 25×25 mm се поставят една по една върху пламъка/дима издигащ се от върха на стоманен комин, в чиято вътрешност е монтиран горящ хартиен фитил потопен в олиото, докато непрекъснатото изгаряне на горивото се случва скорост на въздушния поток от 0,0038 m³/min. Процедурата се повтаря за друга група от три 25×25 mm стъклени подложки при скорост на въздушния поток от 0,0052 m³/min, тъй като това осигурява покрития от въглеродни сажди с различна морфология (квазиквадратна или квазисферична), химичен състав и грапавост. И двете групи се третират допълнително с метанол, етанол и изопропанол, и се функционализират с флуоровъглеродна емулсия за да се получат проби от сажди с персонализирана поръзност и съотношение на функционални групи (О и F атоми). Едно от четирите покрития от сажди от група I се оставя необработено и служи за контрола. Отделно, сажди легирани със сребро се отлагат върху едно стъкло с размери 25×25 mm, следвайки процедурите, описани в раздел 2.1 на глава III. Описаната методология дава три основни групи покрития от сажди, обобщени в таблица 12, вариращи по отношение на морфология, химичен състав, поръзност и грапавост.

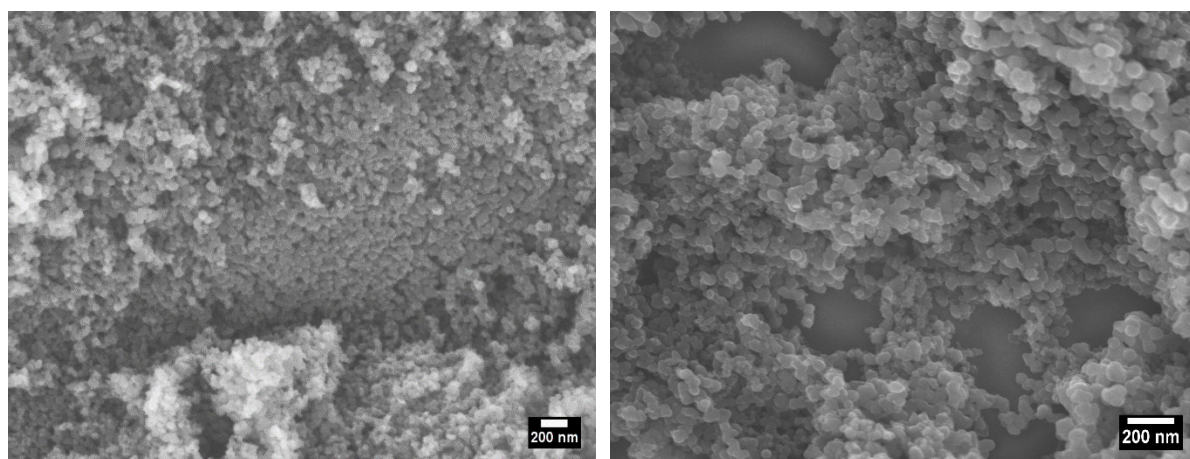
Таблица 12: Групиране на образците. FC означава флуоровъглерод.

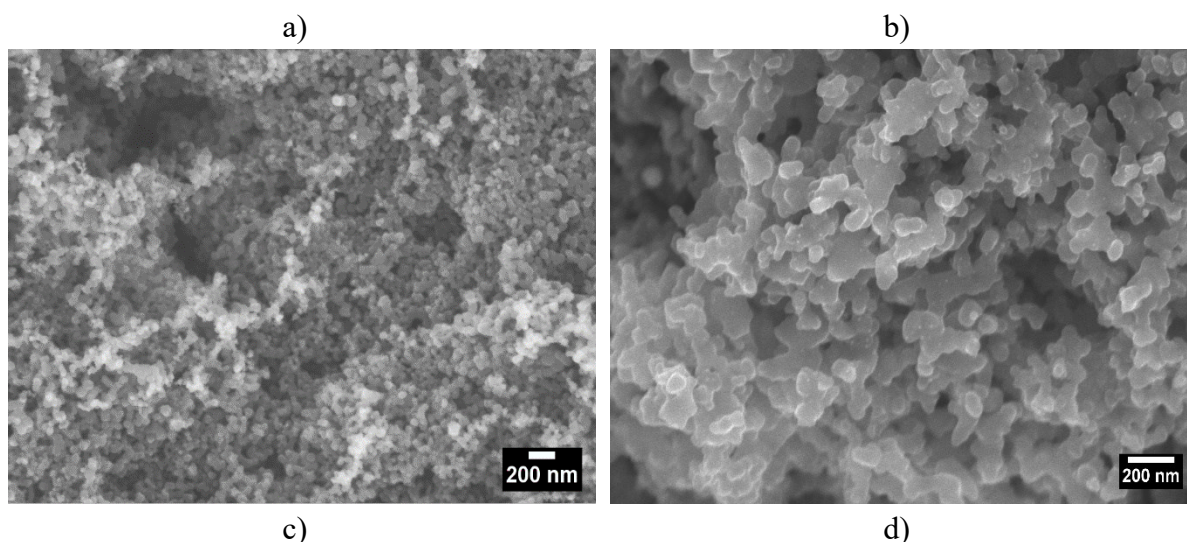
Deposition conditions	Group №	Sample №	Type of material
Air flow – 0.0038 m ³ /min	I	1	quasisquare soot - control
		2	quasisquare soot_CH ₃ OH_FC
		3	quasisquare soot_C ₂ H ₅ OH_FC
		4	quasisquare soot_C ₃ H ₇ OH_FC
Air flow – 0.0052 m ³ /min	II	5	quasispherical soot_CH ₃ OH_FC
		6	quasispherical soot_C ₂ H ₅ OH_FC
		7	quasispherical soot_C ₃ H ₇ OH_FC
Spray deposition	III	8	silver-doped soot

Фигури 24-25 илюстрират морфологичните и структурни особености на трите групи покрития.



Фигура 24: Морфология и структура на покритията от сажди, отложени при скорост на въздушния поток от $0.0038 \text{ m}^3/\text{min}$ а) преди (контролен образец) и след химическа модификация с б) метанол и флуоровъглерод, в) етанол и флуоровъглерод и г) изопропанол и флуоровъглерод.





Фигура 25: Морфология и структура на покритията от сажди, отложени при скорост на въздушния поток от $0.0052 \text{ m}^3/\text{min}$ а) преди (контролен образец) и след химическа модификация с б) метанол и флуоровъглерод, в) етанол и флуоровъглерод и г) изопропанол и флуоровъглерод.

Скоростта на въздушния поток от $0.0038 \text{ m}^3/\text{min}$ генерира сажди с фрактална структура и квазиквадратна морфология, където отделните наночастици са изцяло слети в големи въглеродни агрегати с размери над 200 nm . Покритията, отложени при въздушен поток от $0.0052 \text{ m}^3/\text{min}$, са съставени от ясно разпознаваеми квазисферични частици сажди със среден размер 50 nm . Квазиквадратните и квазисферичните сажди претърпяват видими промени в тяхната поръзност след третиране на пробите с етанол, метанол и изопропанол (виж Фигури 24-25) поради скъсване на връзките между отделните монослоеве сажди посредством полярни взаимодействия. Промените в поръзността се корелират до известна степен с алкохолните модификации, което е особено вярно за образците от група I (виж Фигури 24b, 24c и 24d). Леко разслояване в някои области на квазисферичните сажди е очевидно (виж Фигури 25b и 25c), което се дължи на изключително ниската им механична издръжливост преди функционализация и по-високо съдържание на кислородни функционалности и точкови дефекти, усилващи ефекта на алкохолите върху физикохимичен профил (включително структурната цялост) на този конкретен тип сажди. Легираните със сребро сажди се характеризират със здраво свързани въглеродни агрегати, а потапянето на образците във флуоровъглеродна емулсия създава ковалентно свързан тънък флуорополимерен филм, запазващ първоначалната морфология на покритията.

От таблица 13 е видно, че химическа матрица на всички сажди е изградена от въглерод и малко кислород, свързан с окисляване на крайния продукт по време на синтез и последващото третиране с алкохол.

Таблица 13: Химичен състав на всяка група покрития определен чрез EDS.

Group №	Sample №	Chemical element (at. %)				
		C	O	F	Ag	Other elements
I	1	91.5	1.9	n/a	n/a	6.6
	2	95.5	3.8	0.7	n/a	n/a
	3	93.7	2.1	1	n/a	3.2
	4	90.9	3.6	0.3	n/a	5.2
II	5	87.5	8.5	4	n/a	n/a
	6	84.4	5.7	0.7	n/a	9.2
	7	80.2	8.3	1.4	n/a	10.1
III	8	79.3	5.4	8.6	6.7	n/a

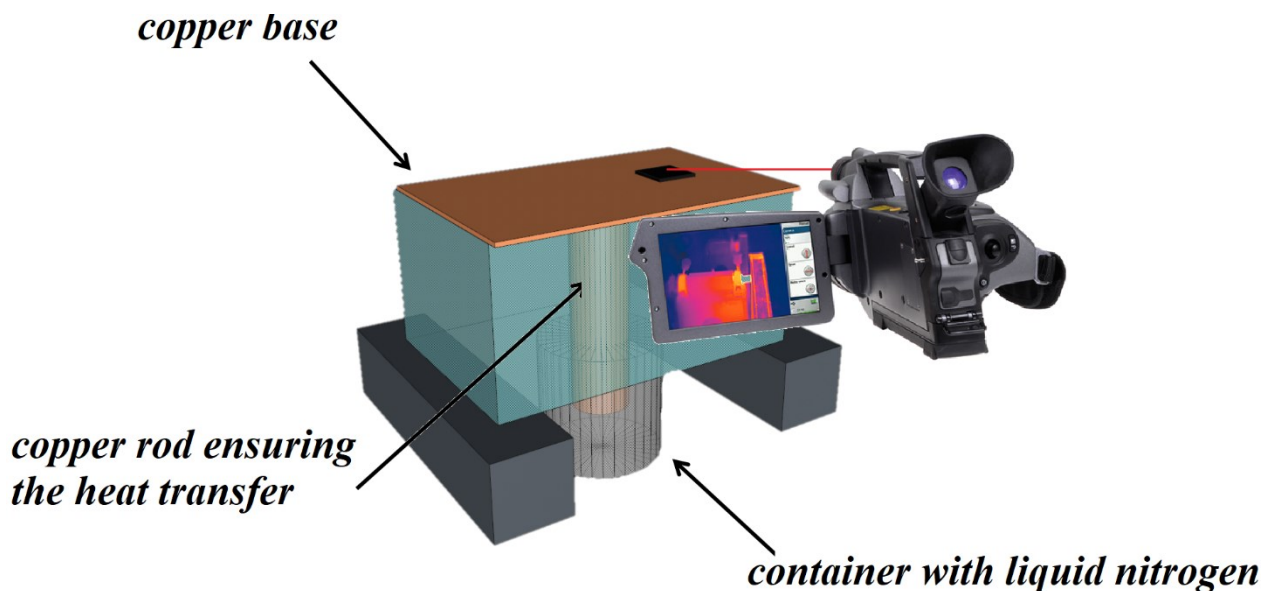
Това увеличава количеството кислородни функционални групи на повърхността благодарение на водородни връзки между хидроксилните комплекси на различните алкохоли (основи) и киселинните групи (напр. C-O-C, C=O) на саждите. Видна е корелация между дължината на алкилната верига на алкохолите, количеството на киселинните и основни групи в саждите, и наблюдаваните промени в порьозността и съотношението на химичните връзки. Най-силен ефект върху порьозността и състава на саждите оказва метанолът поради по-високата му реактивност в течна фаза в сравнение с етанол и изопропанол (виж Фигури 24b и 25a, както и Таблица 13). Другите два химични елемента флуор и сребро, идентифицирани чрез EDS, са свързани с потапянето на саждите във флуоровъглерод или спрейово отлагане на колоидна суспензия, съдържаща AgHF₂, което води до най-висока at. % флуор в легираните със сребро сажди (образец 8). Наличието на други химични елементи като Na, Mg, K, Si, Ca, Al (~3-10 at.%) се дължи на химичния състав на предметните стъкла.

Наред със структурата, морфологията и химичния състав, омокряемостта и грапавината на повърхността са два параметъра необходими за изясняване на цялостния физикохимичен профил на покритията от сажди. Независимо от химическата модификация, всички сажди поддържат много слаб контакт с водните капчици и измерените стойности на ъгъла на омокряне и неговия хистерезис безспорно попадат в обхвата на свръххидрофобност, което предполага висока термодинамична бариера на

нуклеация и по-ниска скорост на топлообмен на границата твърдо тяло-газ и/или твърдо тяло-течност. Има забележими разлики и в средната квадратична грапавост (R_{rms}) на някои покрития от групи I-III ($R_{rms} \sim 79$ nm, 69 nm и 115 nm, съответно за образци 3, 6 и 8), което означава, че по всяка вероятност алкохолите променят профила на грапавините.

2.2. Заскрежаване и разскрежаване на химически модифицирани покрития от въглеродни сажиди

Тези експерименти се провеждат с помощта на охладителната платформа, показана на фигура 26. Тя се състои от специално изработен плексигласов корпус с медна основа, към която перпендикулярно е запоен меден прът пренасящ топлинния поток от малък пластмасов контейнер пълен с течен азот. Термокамера FLIR P640 (FLIR Systems, Вирджиния, САЩ), предварително калибрирана за коефициент на излъчване 0,98 („идеално черно тяло“), записва температурата на повърхността с точност $\pm 0,1$ °C.

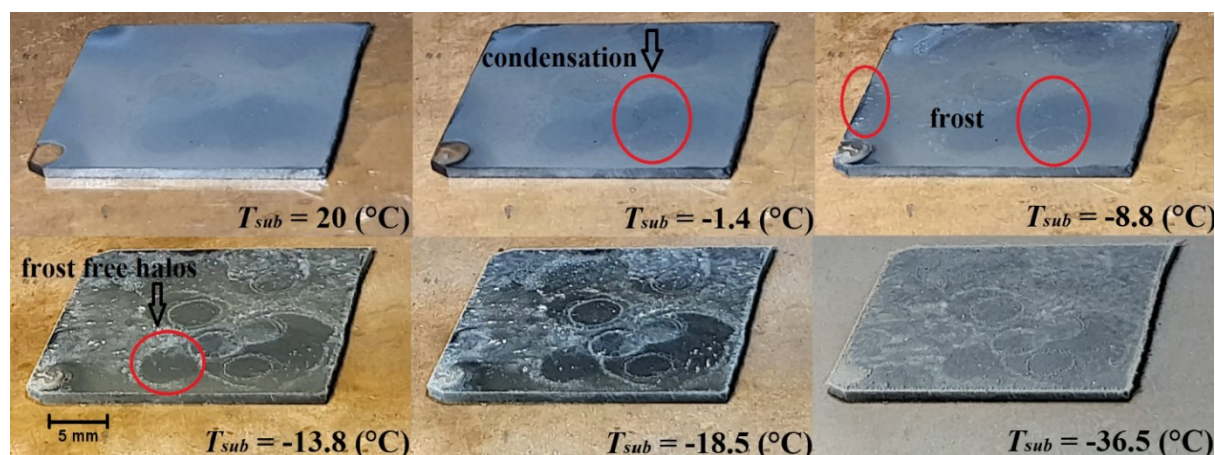


Фигура 26: Схема на експеримента.

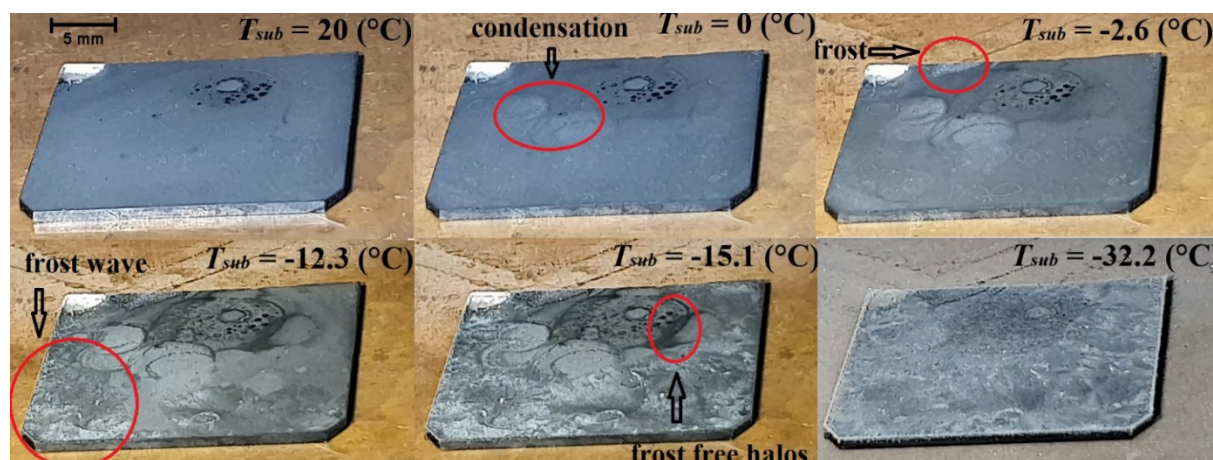
Всички образци се прикрепят към медната основа един след друг и температурата на повърхността се измерва чрез термокамерата. След установяване на липса на температурни градиенти по повърхността ($\pm 0,3$ °C градиент между лявата и дясната страна на основата), медният прът се потапя в пластмасовия контейнер и системата (основата и избраният образец) се охлажда от условия на околната среда ($T_{amb} \sim 23 \pm 0,5$ °C, $RH \sim 35 \pm 0,5$ %, точка на оросяване $\sim 7 \pm 0,5$ °C) до -37 °C, което е най-ниската температура, при която цялата повърхност на сажидите се заскрежава плътно. Скоростта на охлаждане е $V_{cool} \sim 3$ °C/min и се поддържа еднаква за всички измервания. Целият процес се записва непрекъснато с фотоапарат със скорост 60 изображения в секунда.

Накрая, пистолет за горещ въздух се приближава до левия ръб на медната основа под ъгъл на дюзата от 45 ° и системата се загрява от 250 °C горещ въздушен поток докато настъпи размразяване, като процесът отново се записва с фотоапарата.

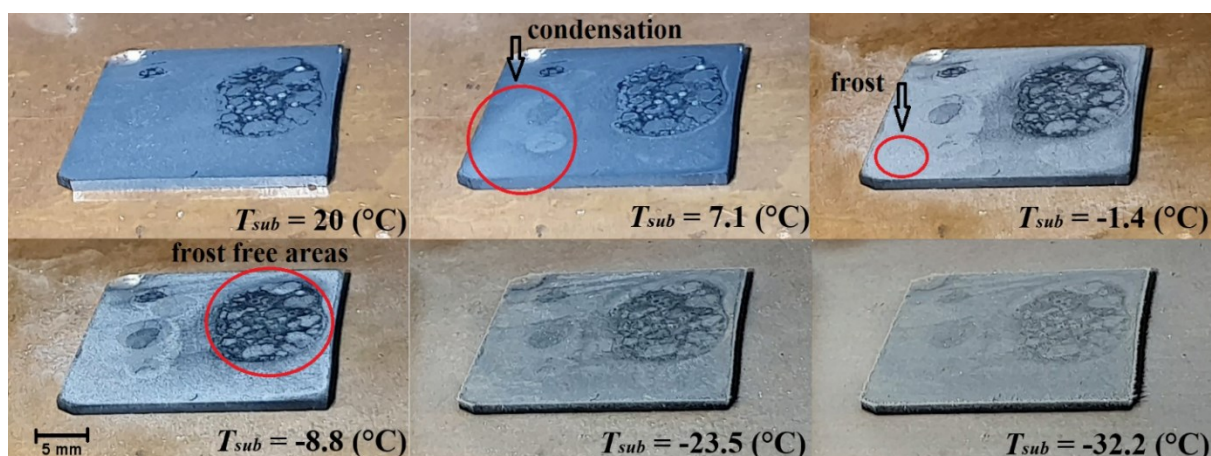
На фигури 27-30 са показани първите експериментални опити да се изучи процесът на заскрежаване на химически модифицирани неомокреями покрития от въглеродни сажди.



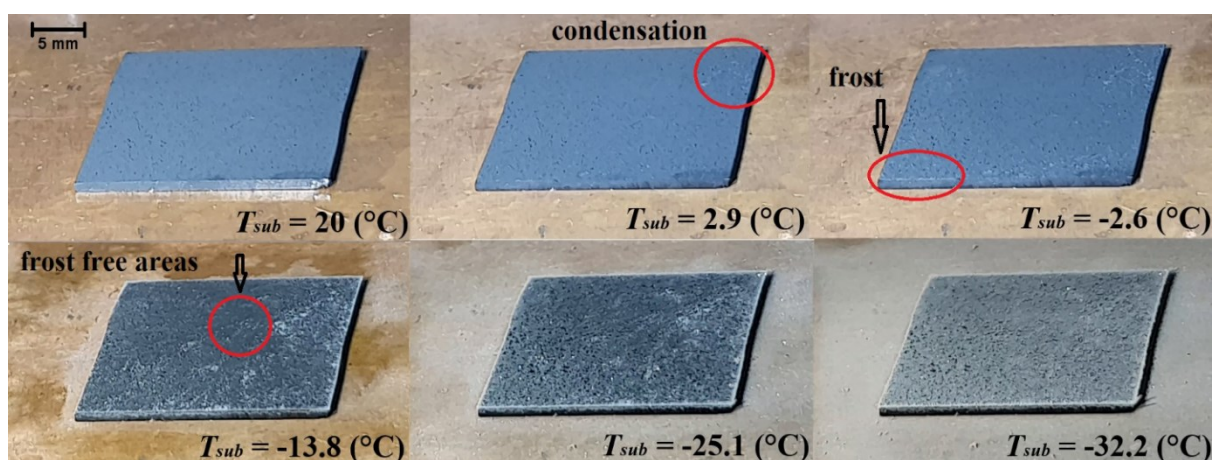
Фигура 27: Кондензация и скрежообразуване върху необработени покрития от сажди с квазиквадратна морфология (контролен образец 1).



Фигура 28: Кондензация и скрежообразуване върху покрития от сажди с квазиквадратна морфология, третиран с метанол и флуоровъглерод (образец 2).



Фигура 29: Кондензация и скрежообразуване върху покрития от сажди с квазисферична морфология, третиран с метанол и флуоровъглерод (образец 5).



Фигура 30: Кондензация и скрежообразуване върху сажди легирани със сребро (образец 8).

От изложените по-горе фигури става ясно, че покритията от сажди поддържат образуването на пръстеновидни ореоли свободни от скреж до определена температура, а самото заскрежаване възниква главно по краищата. Установява се и разлика в общата площ на скрежта от покритие до покритие и най-ниската температура, при която саждите са изцяло покрити със скреж, също е различна.

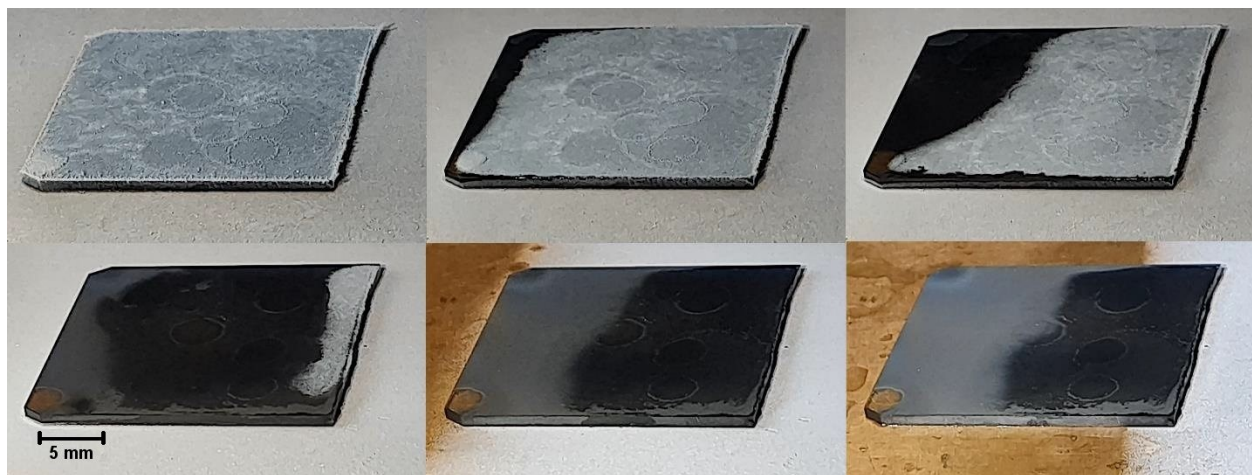
С цел да се установи взаимовръзката между физикохимичните характеристики на саждите и процесите на кондензационно обледеняване, всички експериментални резултати са събрани в Таблица 14. Видимо е, че най-слабо окислените покрития от група I проявяват най-добра ефективност по отношение на потискане на кондензацията на парите и заскрежаването, чието начало настъпва съответно около $-1.4/2.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-2.6/-8.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (виж таблици 13-14). Несъмнено може да се потвърди, че първоначалната научна хипотеза е правилна и нуклеацията на границата сажди-влажнен въздух е

доминирана от хидрофилните активни места (т.е. кислородни групи и дефекти) налични на повърхността.

Таблица 14: Обобщени експериментални данни от кондензационното обледеняване на химически модифицирани неомокряеми покрития от сажиди. Индексите ΔT_{Csup} и ΔT_{Fsup} показват степента на свръхохлаждане необходима за да се задействат процесите на кондензация и заскрежаване.

Group №	Sample №	V_{cool} (°/min)	Dew point (°C)	Condensation onset (°C)	Frosting onset (°C)	ΔT_{Csup} (°C)	ΔT_{Fsup} (°C)
I	1	2.98	7	-1.4	-8.8	8.4	15.8
	2	3.23	7	0	-2.6	7	9.6
	3	2.94	7	1.5	-8.8	5.5	15.8
	4	2.96	7	2.9	-8.8	4.1	15.8
II	5	2.94	7	7	-1.4	0	8.4
	6	3.04	7	5.7	-2.6	1.3	9.6
	7	2.84	7	5.7	-2.6	1.3	9.6
III	8	2.94	7	2.9	-2.6	4.1	9.6

Етапът на размразяване на сажидите, показан на Фигура 31, обогатява познанията за вероятните физикохимични механизми на скрежообразуване върху сажидите. Неомокряемите покрития се размразяват много по-бързо от хидрофилната медна основа, което показва по-слаби адхезионни сили на дендритните кристални структури и по-малко изразходвана топлинна енергия за топене на скрежта. Всички образци, с изключение на контролата, запазват своята неомокряемост след 15 цикъла на заскрежаване и разскрежаване, демонстрирайки нужната механична устойчивост и надеждност за приложения в реални криогенни системи.



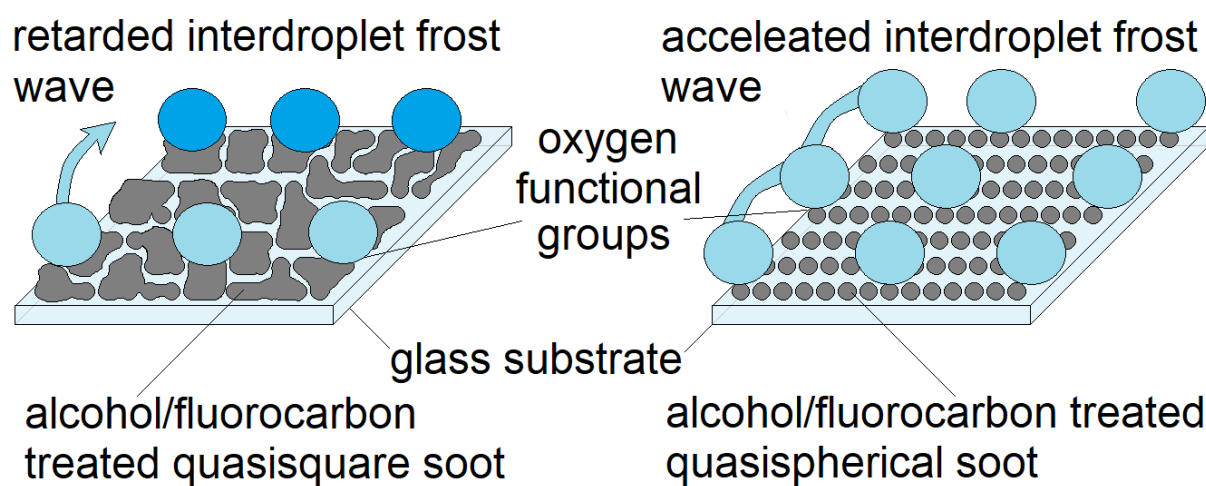
Фигура 31: Етап на топене на скрежта върху сажидите и медната основа.

3. Конфигуриране на химически модифицирани неомокряеми покрития от сажди с цел мултифункционалност

Въпреки експоненциалното развитие на нанотехнологиите в последните години, в научната литература липсват дори спекулативни предположения за това как да се проектират свръххидрофобни повърхности обединяващи ледофобни и антимикробни свойства. Съществува разногласие сред научната общност относно приликите между свръххидрофобност и ледофобност, главно поради сложността на хетерогенното ледообразуване, включващо влиянието на повърхнинната морфология и топография, порьозността, грапавостта, разпределението на захванатия въздушен слой, степента на неомокряемост и дебелината на покритието. Разработването на твърдотелни интерфейси, към които не може да се захваща жива биомаса (бактерии, гъби, водорасли, растения, биомолекули и др.) е голямо предизвикателство. Успехът зависи от вида на микроорганизмите, техния размер, формата и зарядът на клетъчните стени, от оптималния радиус и размер на грапавините, както и разстоянието между тях, определящи потенциала за прикрепване на клетката и последващата ѝ механична деформация. Свръххидрофобните материали могат да смекчат обледеняването чрез понижение в скоростта на топлобмен и отслабване на адхезионните сили на леда (ако все пак настъпи фазов преход), в резултат на минимизираната твърдотелна площ в контакт със замръзващата вода и наличието на захванат между грапавините въздушен слой. Биоадхезията пък се потиска чрез увеличаване на разстоянието между обекта и биозамърсителя или чрез разкъсване на клетките вследствие на възникнало напрежение на опън при „увисване“ на микроорганизмите в пространствата между отделните грапавини. С други думи, това са съвсем различни механизми, чието съчетаване е неясно и тук ще бъде развита кратка хипотеза за съвместяването на антибиоадхезивност и ледофобност в самостоятелно покритие от сажди.

Представяйки проблема в малко по-общ план, универсална повърхност (покритие) обединяваща горните свойства следва да се състои от твърди частици с възможно най-малък размер (нанометричен мащаб) за да се увеличи термодинамичната бариера на Гибс и да се ограничи общата твърдотелна част, която ще се влезе в контакт с водата. По-този начин фазовият преход от течно към твърдо агрегатно състояние може да се забави до няколко часа и повърхността се потопи в течност с биозамърсители, то тя може да остане неколонизирана от микроорганизмите. Друго задължително изискване е да се зададе разстояние между въглеродните агрегати (и/или микро- наностълбчета на една

топографски подредена повърхност) по-малко от размера на биоамърсителите, но достатъчно голямо за да се осигури появата въздушни джобове, повишавайки топлинното съпротивление на материала (забавяйки скоростта на топлообмен) и гарантирайки достатъчно по големина напрежение на опън, което физически да увреди колонизиращите микроорганизми. Отстраняването на кислородни функционални групи от покритата със сажди повърхност е много полезно за предотвратяване на образуването на водородни връзки и контрол на скрежообразуването, както е показано в илюстративен вид на Фигура 32.



Фигура 32: Забавяне на образуването на „ледени мостове“ между кондензатите чрез свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди. Матово синият и небесно син цвят на капките символизира замръзналите и незамръзнали свръхохладени кондензати. Квадратчетата отляво и сферите отдясно отбелязват морфологията на саждите. Линиите под замръзналите капки целят да покажат кислородните функционални групи, служещи като гнезда за ледена нуклеация.

Да предположим, че целта е да се възпрепятства зараждането на ледените кристали при отрицателни температури и едновременно с това да се регулира спонтанното захващане на Грам-положителни или Грам-отрицателни (напр. *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas putida*) бактериални щамове. В този случай би било хипотетично разумно да се използва лабораторна техника за моделиране на повърхности, улесняваща изработката на наностълбчета с дължина и диаметър по-малки от 800 nm и 500 nm, и стъпка между стълбчетата от приблизително 900-1500 nm. Един от най-добрите начини за изпълнение на такава задача е чрез фотолитография, „където слой се осветява през маска“, позволяваща подготовката на добре структурирани повърхности в множество идентични копия. Разбира се, това е скъпа технология, така че шаблонирането или

химическото ецване са относително рентабилни опции, в допълнение към регулирането на физикохимичните характеристики на саждите чрез потапяне в алкохоли с къса алкилна верига и флуоровъглеродни емулсии. Тъй като саждите спадат към семейството на графитоподобните материали, съображения изложени в този раздел биха били приложими и за графен и свързаните с него наноструктури, така че бъдещите изследователски усилия в подобна посока изглеждат оправдани.

4. Динамичен сблъсък на охладени водни капки със заскрежена повърхност от неомокряеми въглеродни сажди

В раздели 2 и 3 на глава IV беше разгледана връзката между физикохимичния профил на саждите и процесите на кондензационно обледеняване, и беше препоръчана оптимална конфигурация на покритието, гарантираща липсата на адхезирала биомаса и натрупан лед/скреж. Следващата стъпка е да се провери дали ако неомокряемата повърхност е заскрежена, динамичният сблъсък с охладени водни капки ще доведе до отскачане или застопоряване на капчиците, съответно до трансформацията им в лед.

4.1. Експериментална постановка

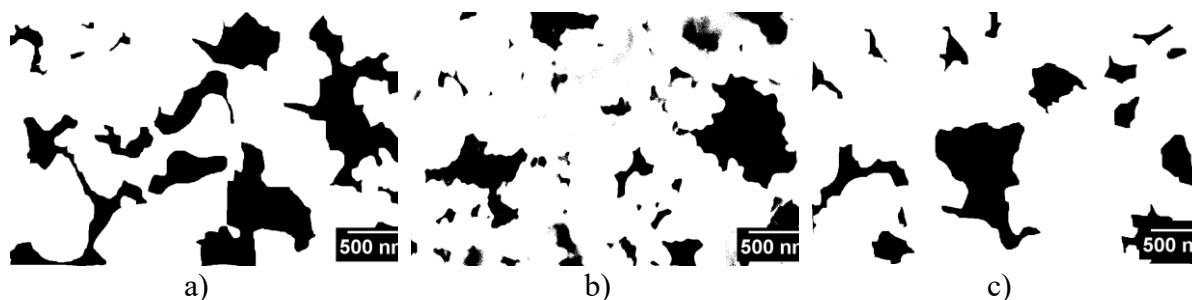
Динамичният сблъсък на охладени водни капки ($T \sim 0^\circ\text{C}$) със саждите се изследва с помощта на охладителната платформа от фигура 26, като върху медната основа е монтиран прозрачен капак от плексиглас, осигуряващ термоизолационна среда без външни замърсители (прахови частици) и оборудван с два прозореца за достигане на капките до покритията. Температурата на медната повърхност и на съответния образец от сажди се определя с двуканален цифров термометър Signstek 31/2 6802 II (Amazon, САЩ) при измервателна грешка от $\pm 0,1-0,4^\circ\text{C}$.

Преди експериментите, всички външни и вътрешни стени на камерата се почистват и дезинфекцират с етанол. След това покритите със сажди предметни стъкла (без тези легирани със сребро) се поставят едно по едно в плексигласовата камера и се охлаждат от стайна температура ($T \sim 22 \pm 2^\circ\text{C}$, $RH \sim 45 \pm 5\%$) до -7°C . След това един от прозорците на капака се оставя отворен за десетина секунди, позволявайки на по-топлата околна водна пара да проникне вътре в камерата и да заскрежи саждите, и 500 μL охладена вода се разпределят върху пробата през пластмасова пипета. В зависимост от механичната сила приложена към пипетата се образуват охладени водни капки с диаметър $D_0 \sim 0,9-6,25\text{ mm}$ и скорост на удара $V_0 \sim 0,23-1,1\text{ m/s}$, което води до динамика на удара при числа на Рейнолдс и Вебер, съответно, $Re \sim 198-3545$ и $We \sim 1-85$. Високоскоростна камера (Nac

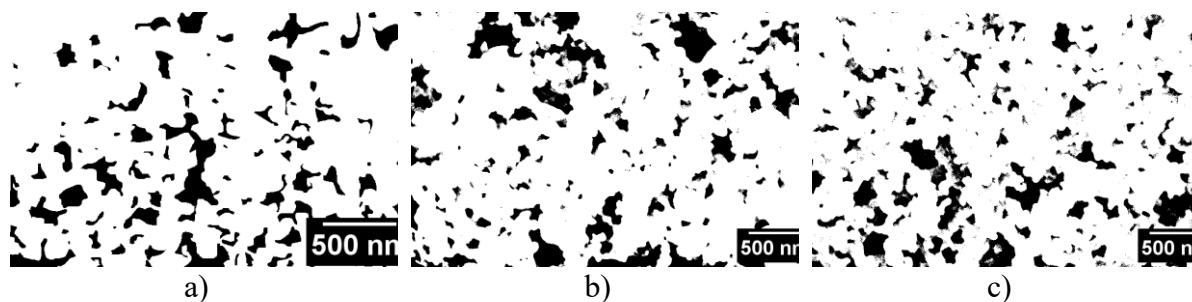
Memrecam NX-6, NAC Image Technology, САЩ), записваща с честота от 2000 кадъра в секунда, се използва за заснемане на различните фази при сблъсъка на капките с хоризонтираната неомокряемата повърхност (ъгъл на наклон $\theta = 0^\circ$).

4.2. Порьозност на неомокряемите покрития от сажди

Класифицирането на порьозността на всички видове сажди е от особено значение за атмосферните науки при изясняване на механизмите на ледена нуклеация в порите на твърдотелните микро- наночастици, които служат като „активни клетки“ за образуване на облаци. В контекста на неомокряемите покрития (повърхности), порите определят и общата твърдотелна площ взаимодействаща с течността. Установено е, че общият обем на мезопорите (размер на порите $\sim 2\text{-}50\text{ nm}$) и повърхнинната площ на отделните наночастици от сажди са приблизително $0.004\text{-}0.08\text{ cm}^3/\text{g}$ и $0.33\text{-}6.9\text{ m}^2/\text{g}$, но начинът по който порите са разпределени в покритията от сажди, особено химически модифицираните им варианти, е неизвестен. Фигури 33-34 разкриват първите опити за количествено определяне на порьозността на химически модифицирани свръххидрофобни покрития от сажди.



Фигура 33: Разпределение на порите в свръххидрофобни покрития от сажди с квазиквадратна морфология на частиците, химически модифицирани с а) метанол и флуоровъглерод, б) етанол и флуоровъглерод и в) изопропанол и флуоровъглерод. Черните участъци очертават порите.



Фигура 34: Разпределение на порите в свръххидрофобни покрития от сажди с квазисферична морфология на частиците, химически модифицирани с а) метанол и

флуоровъглерод, b) етанол и флуоровъглерод и c) изопропанол и флуоровъглерод. Черните участъци очертават порите.

Ламела с ширина 1 μm , дължина 10 μm и дълбочина 10 μm се фрезова във всеки образец от сажди с помощта на двойно фокусиран йонен лъч и сканиращ електронен микроскоп FIB-SEM AURIGA от ZEISS, за да се оцени общата фракция на порите (в проценти) и средният им размер в покритията. Поради тяхната аморфна структура, всички образци се характеризират с произволно ориентирани грапавини разделени от кухини (пори), чийто размер се регулира от полярните и неполярни взаимодействия с алкохола. Саждите с квазиквадратно оформени агломерати се характеризират със среден размер на порите в диапазона от 80-505 nm (т.е. предимно макропори), докато тези с квазисферична морфология съдържат много по-малки пори в рамките на 33-74 nm (т.е. мезопори). За по-правилно разтълкуване на причините за специфичната подредба на порите, експерименталните данни са сравнени в таблица 15.

Таблица 15: Физикохимични характеристики на саждите. С индексите μ и ϕ се отбелязва, съответно, средният размер на порите и общият им процент в неомокряемите покрития.

Group №	Sample №	Morphology and chemical treatment	Soot size	O (at.%)	R_{rms} (nm)	μ (nm)	ϕ (%)
I	1	quasisquare_CH ₃ OH_FC	Aggregates >600 nm	6.7	277	505	27
	2	quasisquare_C ₂ H ₅ OH_FC		6.4	241	80	24
	3	quasisquare_C ₃ H ₇ OH_FC		6.6	256	242	20
II	4	quasispherical_CH ₃ OH_FC	Particles ~55-120 nm	7.9	126	74	17
	5	quasispherical_C ₂ H ₅ OH_FC		7.6	238	45	9
	6	quasispherical_C ₃ H ₇ OH_FC		7.7	199	33	15

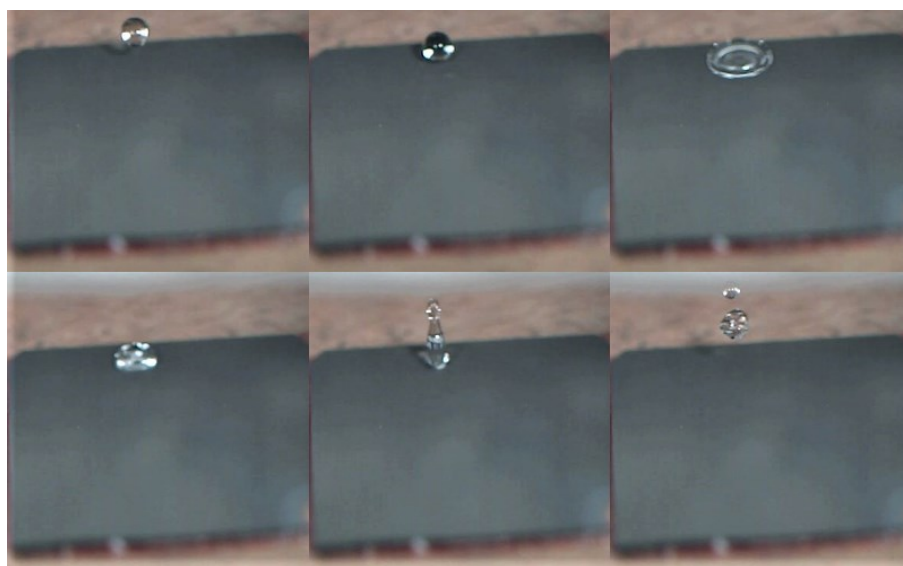
Обстояният преглед на данните в таблица 15 показва, че количеството кислородни атоми, размерът на порите μ и средноквадратичната грапавост R_{rms} на химически модифицираните сажди зависят от реактивността на алкохолите и вида на първичните сажди. Въпреки че това твърдение е изцяло валидно за проби 5-6, в група I се забелязват някои несъответствия. Сред използваните алкохоли метанолът е най-реактивен, така че логиката предполага най-ниски стойности на R_{rms} за образец 1, спрямо образци 2-3, но очевидно това не е така. Вероятно метанолът „разяжда“ саждите и заедно с понижението в дебелината на покритието предизвиква и образуването на допълнителни празнини, което се вижда и при образец 4 (виж таблица 15). Успоредно с това, етанолът е най-слабо

реактивен, но предизвиква най-голям срыв в грапавостта на покритията с квазиквадратна морфология на частиците (образец 2), което предполага по-сложни от установените по-рано механизми на взаимодействие между сажите и алкохола, чието бъдещо изясняване би представлявало интерес за учените работещи в областта на въглеродните материали.

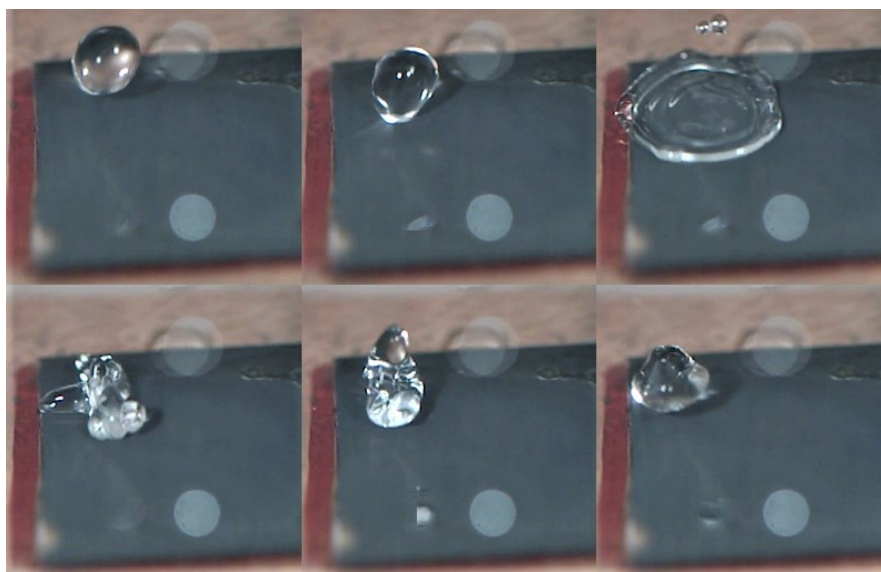
4.3. Динамичен сблъсък с охладени водни капки

4.3.1. В условия на стайна температура

В ранния етап на удара, кинетичната енергия на капката води до нейната деформация и разстилане върху повърхността на сажите под формата на течна дискообразна ламела с ясно обособен ръб, показана на фигури 35-36. Диаметърът на ламелата, известен още като максимален диаметър на разстилане D_{max} , се определя от съотношението на вискозните и капилярните сили. Тъй като свръххидрофобните повърхности (включително тези изработени от сажиди) се разглеждат като „хлъзгави“ (без сили на триене), разсейването на кинетична енергия вследствие на вискозитета на течността (триенето между молекулите в течността) само по себе си е недостатъчно за изчерпване на оставащата енергия на движение (след удара), която се преобразува в повърхнинна енергия и предизвиква отскачане на капките. По време на сблъсъка, времето за контакт между капката и сажите τ определя динамиката на отделяне на течността от повърхността и загубите на енергия, които са количествено изразени чрез коефициента на възстановяване $\varepsilon = V'/V$, където V' е скоростта на капката след сблъсък.

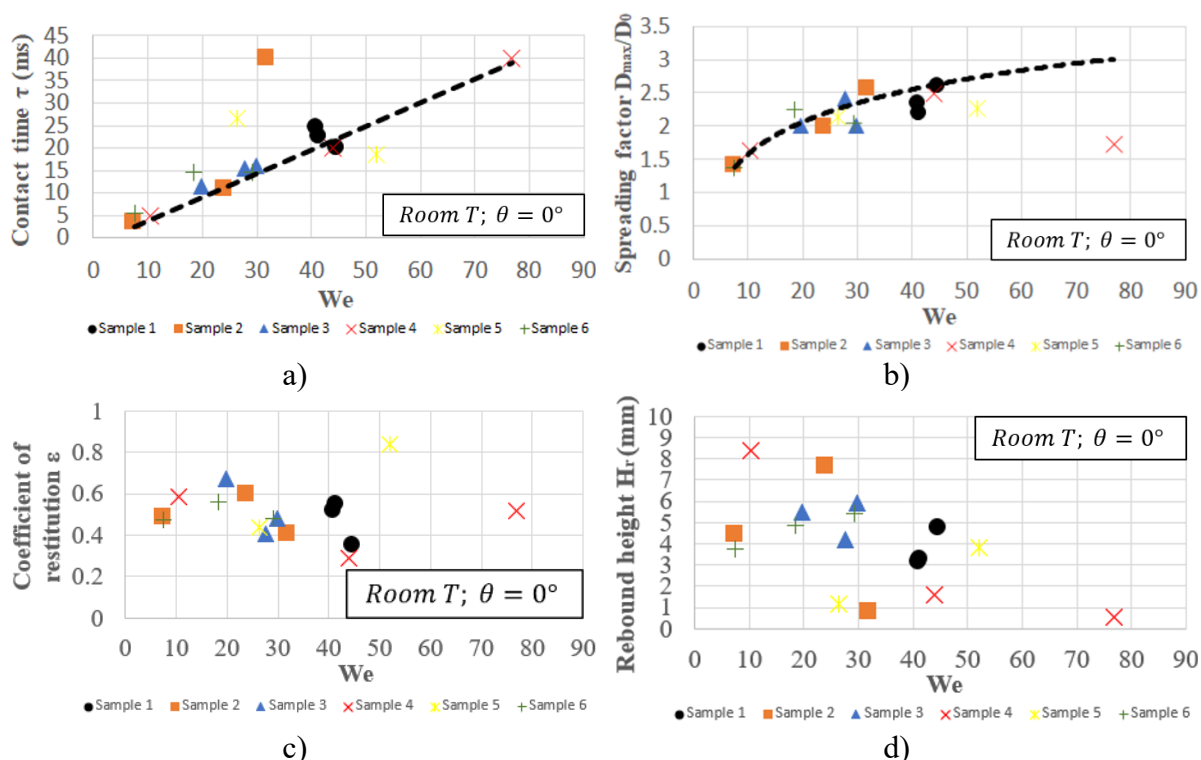


Фигура 35: Сблъсък на водна капка, при стайна температура, с хоризонтирано свръххидрофобно покритие от сажиди с квазиквадратна морфология на частиците, химически модифицирано с метанол и флуоровъглерод (образец 1).



Фигура 36: Сблъсък на водна капка, при стайна температура, с хоризантирано свърххидрофобно покритие от сажди с квазисферична морфология на частиците, химически модифицирано с метанол и флуоровъглерод (образец 4). Капката заема неправилна форма, вероятно поради вихровите сили формиращи се по време на нейното освобождаване от пипетата.

Върху покритията от сажди, τ нараства линейно, докато ε намалява пропорционално на We (с някои спорадични отклонение), според данните на фигура 37.



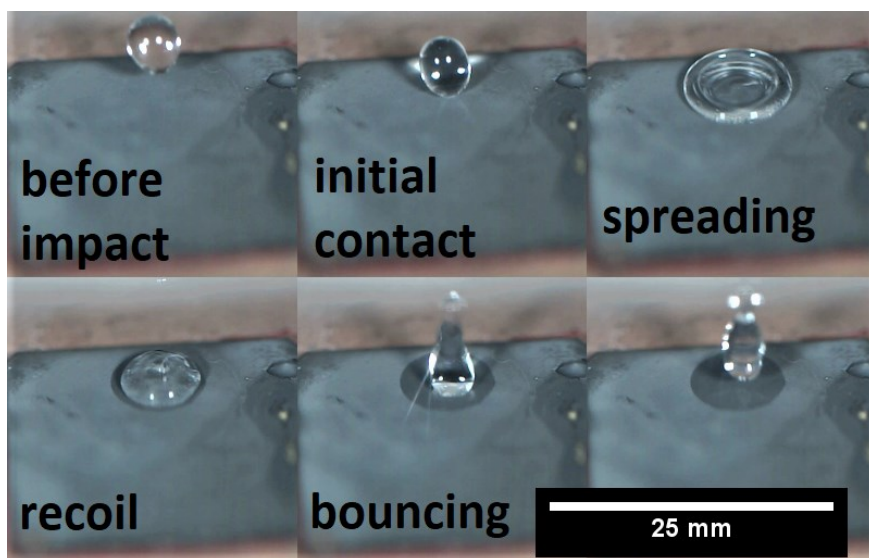
Фигура 37: Зависимост на а) времето за контакт, б) коефициента на разстилане на капката, в) коефициента на възстановяване ε и г) височината на отскок H_r от числото на

Вебер при стайна температура. Отсечките на измервателната грешка не са показани с цел по-добра четливост на графиките.

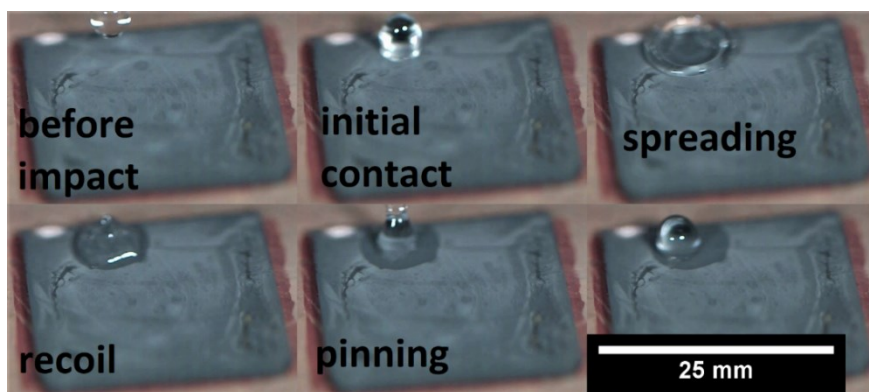
Обосновката е, че при по-високи стойности на We , деформацията на капката е по-силно изразена и разсейването на енергия се увеличава, удължавайки времето на контакт и понижавайки коефициента на възстановяване. Любопитно е, че сажди със съществена разлика в морфологията и порьозността (напр. образци 1-4 или 3-6) поддържат аналогична динамика на сблъсък с водните капки (виж фигура 37 при $We \sim 30-45$), което противоречи на заключението, че морфологичните характеристики и контактната площ между повърхността и капката (зададена от процентното съдържание на пори) регулират първоначалната деформация и разстилането на течността, намеквайки за съществуването на все още неизследвани хидродинамични ефекти.

4.3.2. При заскрежена повърхност

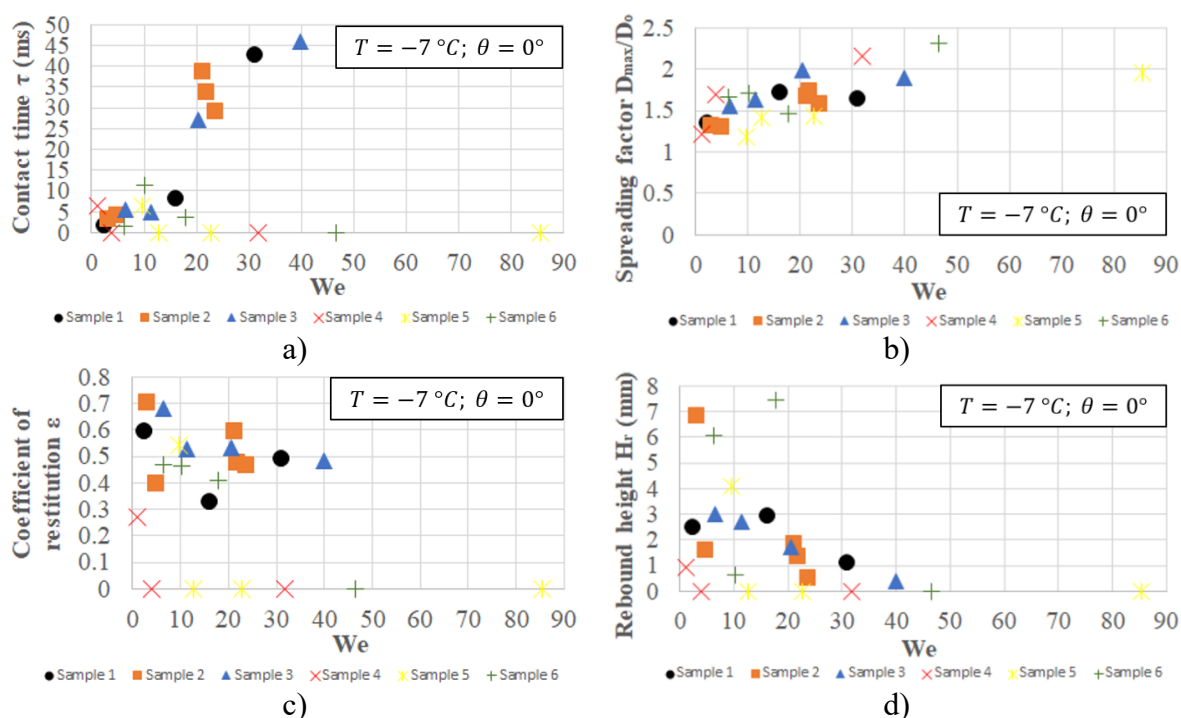
Общоприето е (и експериментално доказано), че отскачане на водни капки при сблъсък с неомокряеми повърхности не се наблюдава при наличието на кондензирана водна пара или скреж. Причината е свързана със възникването на „водни мостчета“ вътре в микро-нанотекстурите, действащи като ядра за ледена нуклеация и предизвикващи преход от неомокряемост към омокряемост на повърхността. В този подраздел ще покажем, че независимо от появата на тънък слой скреж, отскок на капката е възможен при определена повърхнинна конфигурация на саждите, както е обобщено на фигури 38-40.



Фигура 38: Сблъсък на охладена водна капка със заскрежено свърххидрофобно покритие от сажди с квазиквадратна морфология на частиците, химически модифицирано с метанол и флуоровъглерод (образец 1).



Фигура 39: Сблъсък на охладена водна капка със заскрежено свърххидрофобно покритие от сажди с квазисферична морфология на частиците, химически модифицирано с метанол и флуоровъглерод (образец 4).



Фигура 40: Зависимост на а) времето за контакт, б) коефициента на разстилане на капката, в) коефициента на възстановяване ϵ и г) височината на отскок H_r от числото на Вебер при $T = -7$ °C. Отсечките на измервателната грешка не са показани с цел по-добра четливост на графиките.

Ударът на охладени водни капки върху заскрежено свърххидрофобно покритие от сажди с квазиквадратна морфология на частиците, макропори и слабо повърхностно окисление е придружено с отскок на капките, докато при другия вид сажди с квазисферични частици, мезопори и голямо количество кислородни функционални групи се наблюдава имобилизация на капката (виж таблица 15 и фигури 38-39). При $We \leq 10$ броят на отскоците варира в рамките на $1 \leq N_r \leq 9$, но с увеличаване на числото на

Вебер до $We \geq 20$, отскоците достигат $N_r \leq 1$ независимо от повърхнинния профил на сажите. При покритията поддържащи режим на отскачане (главно образци 1-3), τ е правопропорционално на коефициента на разстилане D_{max}/D_o и обратнопропорционално на височината на отскок H_r (виж фигура 40). При $T = -7^\circ\text{C}$, τ се увеличава, а H_r намалява поради повишаване на вискозитета на течността и по-голямо разсейване на кинетична енергия във вътрешността на капката и около контактната линия, в сравнение със условията при стайна температура, потвърждавайки отново, че получените резултати са автентични.

5. Динамика на замръзване на статични водни капки върху химически модифицирани свръххидрофобни покрития от сажиди.

Ледофобните свойства на покритията са обобщени в таблици 16-17.

Таблица 16: Средно време на замръзване на охладени водни капки с различен обем, като функция на физикохимичния профил на сажидите. Индексите t_{ini} и t_{fin} показват времето необходимо за първоначално и пълно замръзване на капката.

Group №	Sample №	Morphology	h (μm)	R_{rms} (nm)	O (at. %)	T_{sub} (°C)	V (μL)	t_{ini} (s)	t_{fin} (s)		
I	1	Quasisquare with agglomerates >200 nm	9.3	119	2.7	-30	10 50	7 23	71 152		
	2		9	174	7.2	-30	10 50	11 15	74 112		
	3		19.7	314	6	-30	10 50	10 32	75 187		
	4		15.6	301	6.5	-30	10 50	9 35	78 188		
	II		5	Quasispherical with particles ~50 nm	5.4	262	9.1	-30	10 50	14 10	64 112
			6		9.4	228	7.4	-30	10 50	15 20	65 153
			7		6.6	202	8.4	-30	10 50	14 18	70 118
			III		8	>200 nm; <200 nm	11.4	111	6.03	-30	10 50
IV		glass			-						-

Видно е, че сажидите потискат образуването на лед и изместват точката на замръзване на капката към по-ниски температури и независимо от вида им, времето за ледена нуклеация се забавя с близо десет пъти, а температурата на кристализация се понижава със $7\text{-}10^\circ\text{C}$ в сравнение с непокрита стъклена подложка. Малките обеми течности

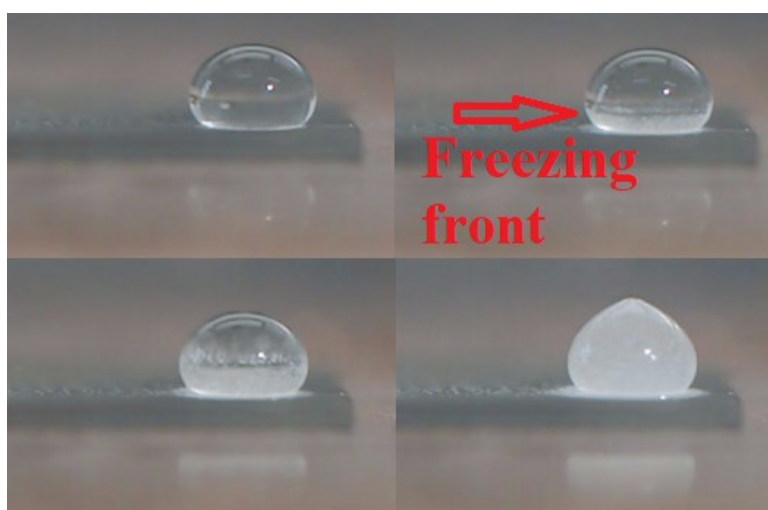
замръзват три пъти по-бавно върху непокритото стъкло (виж таблица 16) и това се обяснява със стохастичния характер на хетерогенната нуклеация (т.е. може да се анализира статистически, но не може да се предскаже), който на нанониво зависи от времето и от количеството „активни клетки“ за образуване на ледени ядра. По-големите обеми на водните капки улесняват образуване на ледени зародиши поради по-голямата вероятност ядрото да се формира на стохастичен принцип.

Таблица 17: Средна температура на замръзване на охладени водни капки с различен обем, като функция на физикохимичния профил на саждите. Индексите T_{ini} и T_{fin} показват температурата на първоначално и пълно замръзване на капката. V_{cool} е скоростта на охлаждане.

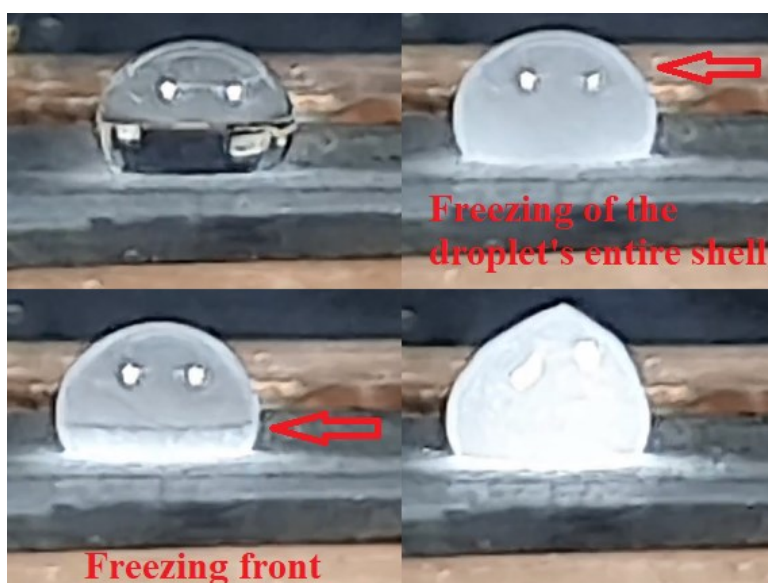
Group №	Sample №	Morphology	h (μm)	R_{rms} (nm)	O (at. %)	V_{cool} (°C/min)	V (μL)	T_{ini} (°C)	T_{fin} (°C)
I	1	Quasisquare with agglomerates >200 nm	9.3	119	2.7	4.77	10	-15.8	-24.3
					4.5	50	-14.6	-24.3	
	2		9	174	7.2	4.72	10	-12.5	-22.8
					4.17	50	-20	-23.6	
	3		19.7	314	6	4.7	10	-16.2	-23.8
					4.14	50	-14	-23.4	
	4		15.6	301	6.5	4.82	10	-20.6	-26.8
					4.27	50	-15.9	-24	
II	5	Quasispherical with particles ~50 nm	5.4	262	9.1	4.12	10	-15.4	-20.9
					4.29	50	-14.9	-23.5	
	6		9.4	228	7.4	4.18	10	-16.5	-21.7
					4.31	50	-13.5	-22.1	
	7		6.6	202	8.4	4.23	10	-16.9	-23.4
					4.23	50	-12.9	-23.5	
III	8	>200 nm; <200 nm	11.4	115	6.03	4.2	10	-15.8	-23.1
					4.24	50	-14	-23.3	
IV	glass	-	-	-	-	4	10	-13.4	-16.2
						4.27	50	-10.6	-17.5

Два различни режима на замръзване на водата, обозначени като „обемно замръзване“ и „замръзване по контур“, се забелязват по време на видеозаписа на експериментите, както е показано на моментните снимки на фигури 41-42. Когато водната капка попадне върху предварително охладено свръххидрофобно покритие от сажиди, тя замръзва по традиционния двуфазен начин (виж Фигура 41), а именно частично замръзване възникващо на границата твърдо тяло-течност, последвано от изотермично замръзване на останалата течна фракция, генерирайки остър леден връх вследствие на обемното

разширение на водата и ефекти от повърхностното напрежение. Ако капката се охлажда едновременно с медната основа на охладителната платформа, първоначалното обледеняване обхваща както контактната линия на трите фази (твърдо тяло, течност, въздух), така и цялата външна обвивка на течността, а по-късно фронтът на замръзване се разпространява от границата твърда повърхност-въздух-лед към незамразения обем (виж фигура 42). Това изглежда, че е „хибридна версия“ на така нареченото „замразяване отвън навътре“, описано от Wildeman et.al. и Graeber et.al. в контекста на зрелищната спонтанна експлозия на водни капки.



Фигура 41: Обемно замръзване на водна капка върху свръххидрофобно покритие от въглеродни сажди с температура от $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

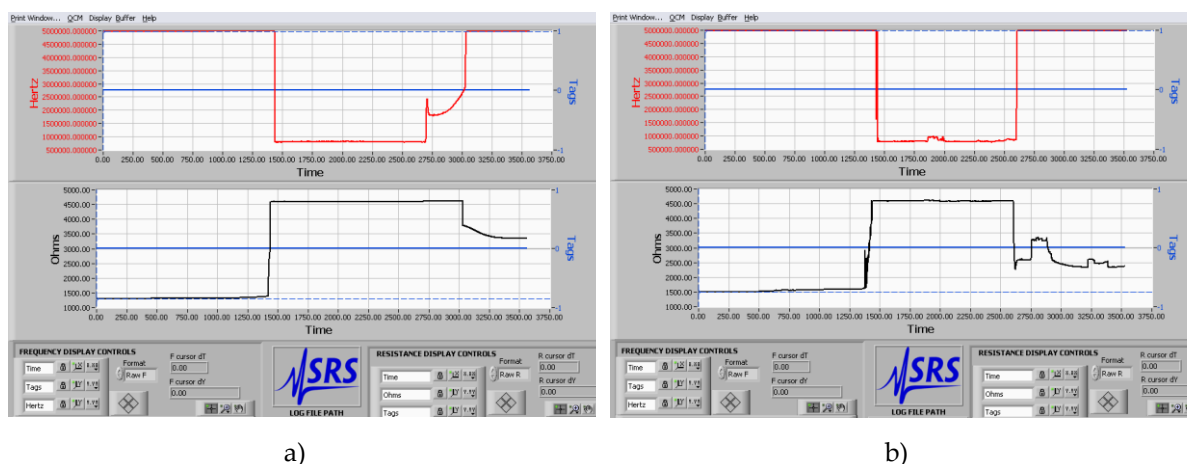


Фигура 42: Замръзване по контур на водна капка върху свръххидрофобно покритие от въглеродни сажди при едновременно охлаждане на цялата платформа и капката.

6. Проследяване на режимите на замръзване на водни капки чрез неомокряема КМВ покрита с въглеродни сажди.

Предишният раздел показва, че техниката на охлаждане е строго определяща за контролиране на динамиката на замръзване на водни капки поставени върху химически модифицирани свръххидрофобни покрития от сажди. Този резултат има съществено практическо значение при изработката на композитни материали със седефена структура, например, което става чрез контрол на позицията и развитието на ледения фронт в капката. От тази гледна точка, наличието на подходящ метод за извличане на точна информация относно дебелината на ледения слой по време на първоначалното замръзване и местоположението на началните ледени ядра по протежение на твърдата повърхност би било от полза за изясняване на произхода и физиката на различните видове режими на замръзване на водата върху свръххидрофобни покрития.

При постепенно охлаждане на покритието от сажди и водната капка, първоначалното замръзване обхваща цялата външната обвивка на течността, като това рядко явление може да се изследва с неомокряема КМВ, както е онагледено на фигура 43, където основната хипотеза е, че разликите в масонатоварването по време на фазовите преходи ще допринесе за изясняване на физическите механизми на различните режими на замръзване на водните капки.

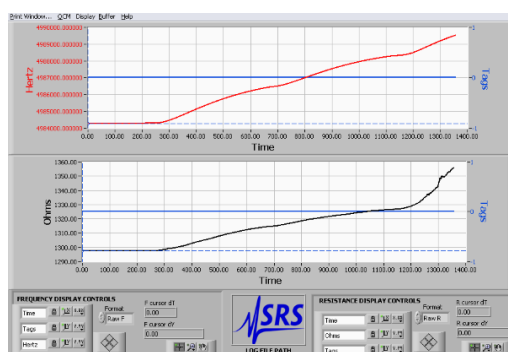


Фигура 43: Сензорен отклик на две неомокряеми 5 MHz КМВ покрита с въглеродни сажди при а) обемно замръзване и б) замръзване по контур на 50 μL водна капка поставена в средата на сензорната повърхност.

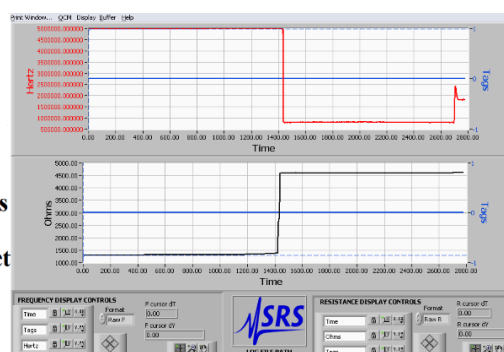
Внимателното тълкуване на двете резонансни криви разкрива няколко основни характеристики на записаните сигнали. Замръзването на капката води до затихване на осцилациите и пиезосензорите излизат от резонанс ($f \sim 1 \text{ MHz}$; $R \sim 5000 \Omega$). Етапът на

размразяване е придружен от възстановяване на резонансната честота, но ясно се вижда и един любопитен резултат. След пълно втечняване на капката, стойността на серийното съпротивление R при замръзване по контур е по-близо до базовата линия в сравнение със случая на обемна нуклеация (вижте фигури 43а и 43b). При еднакви скорости на размразяване (зададени от постоянната стайна температура), сензорното устройство регистриращо режима на обемно замръзван се нуждае от по-дълго време за да достигне базовата честота (~ 1600 s на фигура 43а и ~ 1200 s на фигура 43b). Тези наблюдения подсказват за много различни адхезионни сили на леда, поддържани от двата режима на замръзване, но графиките, представени на фигура 43 не предоставят информация за показанията на свръххидрофобните КМВ в момента на първоначалното замръзване, което е от значение за изясняването на физиката на ледообразуване.

Фигура 44 цели да премахне горепосочените ограничения, като представи резонансното поведение на устройствата непосредствено преди и след първоначалното замразяване на капката.



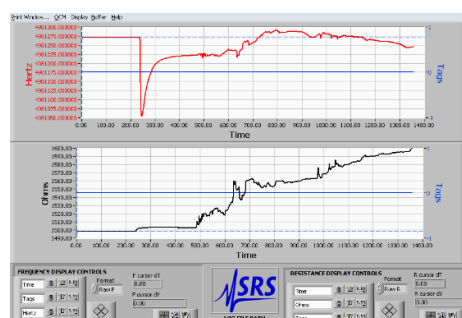
Temperature-induced frequency and resistance shifts prior to depositing the water droplet



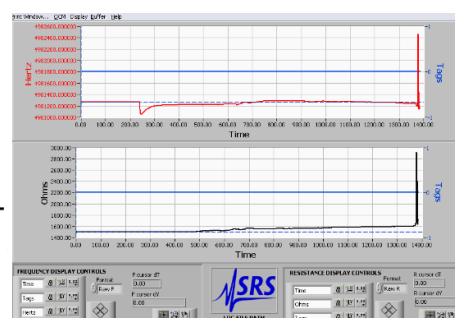
The QCM is out-of-resonance once the recalescent freezing occurs

A few seconds following the cooled droplet deposition

a)



Temperature-induced frequency shifts during the simultaneous water droplet/sensor surface cooling



Regardless of the contour freezing, the sensor is still in resonance for a certain time range

a few seconds after freezing of the solid-liquid interface and the entire drop's outer shell

b)

Фигура 44: Сензорен отклик на две неомокряеми 5 MHz КМВ покрити с въглеродни сажди непосредствено преди (лявата страна) и след първоначално замръзване (дясната

страна) на 50 μL водна капка поставена в средата на сензорната повърхност по време на а) обемно замръзване и б) замръзване по контур.

Лявата страна на фигура 44 онагледява температурно-индуцираните промени в честотата и съпротивлението, генерирани от термичното разширение/компресия на кварцовия кристал, което пряко влияе върху резонансната честота. Бързите топлинни флуктуации причиняват положителни промени в честотата, ако повърхността не е предварително натоварена с водна капка, в съответствие с документираните динамични температурно-честотни характеристики на 16 MHz КМВ покрити със сажди. Натоварването на сензорната повърхност с течност допринася за по-сложна динамика в резонансното поведение на кристала и изглежда, че промените във вискозитета/плътността на капката причиняват реципрочно низходящо отклонение на честотата в даден момент.

Неомокремите КМВ реагират различно на обемното и контурното замръзване и както е показано на Фигура 44а, няколко секунди след отлагането на капката, първоначалното замръзване извежда сензора от резонанс. Вместо това залеждането на обвивката на капката не влошава мигновено резонанса и сензорът продължава да поддържа непрекъснати трептения за определено време.

Графичните зависимости на фигури 43 и 44 не могат да се използват за извличане на допълнителна информация относно точното изминало време преди КМВ да излязат от резонанс, нито точните стойности на честотата, съпротивлението и отместената маса при първата фаза на замразяване, първоначално и пълно размразяване (числовите стойности за пълното замръзване не са налични, тъй като последното е съпроводено със скок на фалшива честота). Следователно е необходимо да се анализират подробно цифровите данни за всеки етап. обобщени в таблици 18-20.

Таблица 18: Обобщени цифрови данни от сензорния сигнал. Δf_{TFC} ; ΔR_{TFC} ; Δm_{TFC} представляват температурно-индуцираните промени в честотата, динамичното съпротивление и отместената маса. Δf_{IF} ; ΔR_{IF} ; Δm_{IF} показват резонансната честота, динамичното съпротивление и отместената маса при първоначално замръзване на капката. Δf_{IT} ; ΔR_{IT} ; Δm_{IT} – резонансна честота, динамично съпротивление и отместена маса при първоначално размразяване на капката. Δf_{FT} ; ΔR_{FT} ; Δm_{FT} – резонансна честота, динамично съпротивление и отместена маса при пълно размразяване на капката.

Freezing mode	Δf_{TFC} (Hz)	Δf_{IF} (Hz)	Δf_{IT} (Hz)	Δf_{FT} (Hz)	ΔR_{TFC} (Ω)	ΔR_{IF} (Ω)	ΔR_{IT} (Ω)	ΔR_{FT} (Ω)	Δm_{TFC} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Δm_{IF} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Δm_{IT} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Δm_{FT} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
bulk	5587	3110	636	285	81	1482	2693	2039	-99	-55	-11	-5
	4582	3180	4305	413	-125	531	2405	905	-81	-56	-76	-7
	4427	1522	2627	294	3	1238	2753	1852	-78	-27	-46	-5
contour	-86	750	5197	-393	164	384	2435	869	1.5	-13	-92	7
	-366	4644	4922	-380	396	844	2671	803	6.5	-82	-87	7
	-77	3235	5619	-308	50	935	2027	237	1.4	-57	-99	5.4

Таблица 19: Действителен сензорен отклик след компенсация на температурния ефект.

Freezing mode	$\Delta f_{IF} - \Delta f_{TFC}$ (Hz)	$\Delta f_{IT} - \Delta f_{TFC}$ (Hz)	$\Delta f_{FT} - \Delta f_{TFC}$ (Hz)	$\Delta R_{IF} - \Delta R_{TFC}$ (Ω)	$\Delta R_{IT} - \Delta R_{TFC}$ (Ω)	$\Delta R_{FT} - \Delta R_{TFC}$ (Ω)	$\Delta m_{IF} - \Delta m_{TFC}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$\Delta m_{IT} - \Delta m_{TFC}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$\Delta m_{FT} - \Delta m_{TFC}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
bulk	-2477	-4951	-5302	1401	2612	1958	44	88	94
	-1402	-277	-4169	656	2530	1030	25	5	74
	-2905	-1800	-4133	1235	2750	1849	51	32	73
contour	836	5283	-307	220	2271	705	-14.5	-93.5	5.5
	5010	5288	-14	448	2275	407	-88.5	-93.5	1.5
	3312	5696	-231	885	1977	187	-58.4	-100.4	4

Таблица 20: Числови данни касаещи времето необходимо за първоначално замръзване (t_{IF}), излизане на сензора извън резонанс (t_{OR}), първоначално (t_{IT}) и пълно (t_{FT}) размразяване.

Freezing mode	t_{IF} (s)	t_{OR} (s)	t_{IT} (s)	t_{FT} (s)	$t_{IT}+t_{FT}$ (s)
bulk	12	1	1598	859	2457
	24	1	1090	1217	2307
	7	2	978	935	1913
contour	n/a	62	1167	1010	2177
	n/a	102	1149	1105	2254
	n/a	149	866	643	1509

Началото на обемното замразяване при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ понижава резонансната честота и увеличава динамичното съпротивление и стойността на отместената маса (виж таблици 18-20) – резултат, отразяващ напълно физическите основи на уравнението на Зауербрай. Пълното втечняване на ледени капки ($T \sim 17\text{ }^{\circ}\text{C}$) премества сигнала над базовата линия, т.е. забелязва се отклонение на резонанса към по-високи честоти (виж данните за Δf_{FT} в таблица 18). Режимът на замръзване по контур стимулира постоянни отмествания на

честотата нагоре по време на началния етап на замръзване ($T \sim -14\text{ }^{\circ}\text{C}$), докато пълното размразяване ($T \sim -12\text{ }^{\circ}\text{C}$) се отбелязва с изместване на резонансната честота под базовата линия (виж стойностите на Δf_{FT} в таблица 18). Съпоставянето на тенденцията на динамичното съпротивление за двата режима на нуклеация показва, че при размразяване стойността на ΔR при обемно замръзване е до девет пъти по-висока, отколкото при замръзване на контура (виж данните за ΔR_{FT} в таблици 18-19). Излизането на сензора от резонанс се осъществява приблизително сто пъти по-бавно, когато нуклеацията настъпва едновременно на контактната площ твърдо тяло-течност и по обвивката на капката и във всичките три експеримента ледената капка се втечнява по-бързо (виж таблица 20). Тези резултати показват, че при замръзване по контур адхезионните сили са по-слаби в сравнение с обемното замръзване и първоначално формираната ледена обвивка е по-тънка, което доказва, че неомокряемите КМВ покрити със сажди могат да се използват за анализ на различни фазови преходи от течно към твърдо агрегатно състояние.

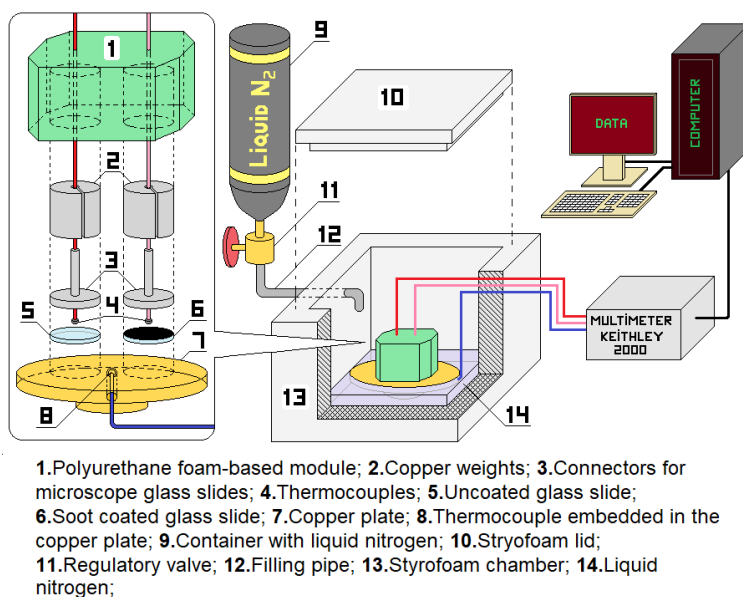
7. Процеси на топлообмен в обема на свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди

Раздел 4 от тази глава обобщава резултатите от изследванията свързани с ледофобните свойства на саждите от рапично олио. Все още не става ясно, обаче, как топлинният поток се разпространява през обема на покритията от сажди, преди да достигне повърхността и да премине към течността, в резултат на което не е известно дали има някакви разлики между механизмите на топлопроводност в обема и на повърхността на неомокряемия интерфейс, което пряко засяга процесите на формиране на лед. Изследването представено по-долу запълва тази празнина в научното познание и представя нови данни за топлинното съпротивление на първични и химически модифицирани свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди.

7.1. Експериментална платформа за нискотемпературни изследвания

Топлинното съпротивление на първични и химически модифицирани покрития от сажди е изследвана с помощта на специално проектирана затворена температурна система, илюстрирана на фигура 45. Състои се от стиропорна камера, към чието дъно е закрепена кръгла медна плоча изпълняваща ролята на топлопроводник. Отгоре върху плочата е монтиран полиуретанов модул с два ръчно пробити кръгли отвора $25 \times 25\text{ mm}$, побиращи непокритите (контролен образец) и покрити със сажди стъклени подложки, заедно с два чифта медни тежести и конектори, осигуряващи добър термичен контакт

между проводящата плоча и образците. Тяхната температура се измерва едновременно с помощта на три термодвойки, свързани към мултицет Keithley 2000 (Tektronix, САЩ), и се записва на настолен компютър при 1 s чрез компютърен софтуер LabView 6.1. Регулаторен клапан и тръба за пълнене контролират дебита на течен азот, който постъпва в камерата за да се поддържа постоянна скорост на охлаждане $V_{cool} \sim 0,09 \pm 0,004$ °C/s.



Фигура 45: Илюстрация на експерименталната процедура.

7.2. Температурно поведение на свръххидрофобни покрития от сажиди при охлаждане

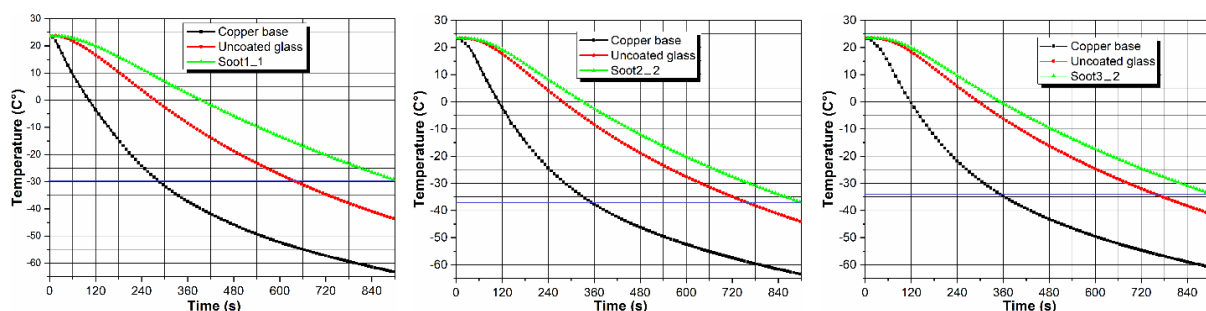
Покритията използвани в това изследване имат същите физикохимични характеристики като тези описани в раздели 2-3-4 на тази глава, а номенклатурата на пробите е показана в таблица 21.

Таблица 21: Групиране на образците. Буквата М означава „химически модифицирани“, докато FC е съкращение за флуоровъглерод.

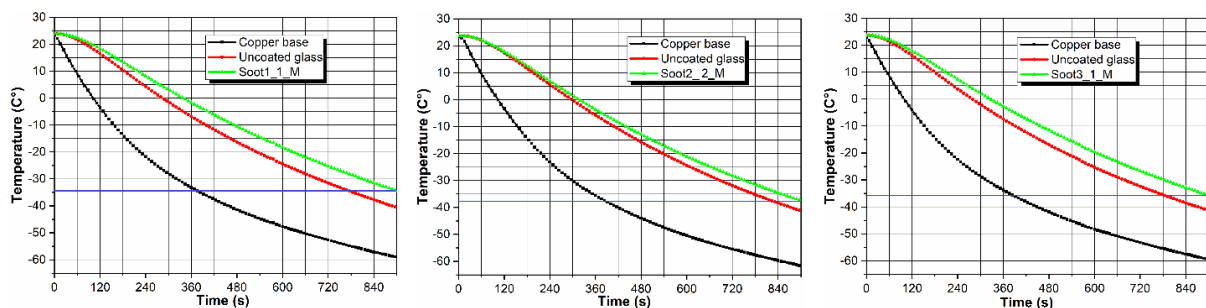
Sample №	Nomenclature	Air flow rate (m ³ /min)	Deposition time <i>t</i> (s)	Morphology and chemical treatment
1	soot1_1	0.0052	120	pristine quasispherical
2	soot1_2			
3	soot2_1			
4	soot2_2	0.0042	80	pristine mixed
5	soot3_1			
6	soot3_2	0.0033	60	pristine quasisquare

7	soot1_1_M	0.0052	120	quasispherical_ C ₂ H ₅ OH_FC
8	soot1_2_M			
9	soot2_1_M			
10	soot2_2_M	0.0042	80	mixed_ C ₂ H ₅ OH_FC
11	soot3_1_M			
12	soot3_2_M	0.0033	60	quasisquare_ C ₂ H ₅ OH_FC

Фигури 46 и 47 показват степента на охлаждане на проводящата плочка, непокритите и покрити със сажди образци в рамките на 880 s.



Фигура 46: Изменения в температурата на проводящата медна плочка (долна линия), непокрито стъкло (средна линия) и неомокряемо стъкло покрито с различни модели на първични сажди (горна линия) при охлаждане с течен азот.



Фигура 47: Изменения в температурата на проводящата медна плочка (долна линия), непокрито стъкло (средна линия) и неомокряемо стъкло покрито с различни химически модифицирани сажди (горна линия) при охлаждане с течен азот.

При еднакви други условия, свръххидрофобното стъкло винаги е по-слабо охладено от течния азот в сравнение с непокритата подложка, но температурният градиент между образците зависи от категорията на саждите. Покритията със „смесена“ морфология са склонни към по-бързо охлаждане от тези съставени от квазисферични наночастици, независимо дали са в първична или химически модифицирана форма. Саждите с квазиквадратна форма заемат междинно място по отношение на склонността си към охлаждане.

За да се корелира степента на охлаждане (топлинното съпротивление) с физикохимичния профил на саждите, данните касаещи техните морфохимични характеристики и експериментално установените температурни градиенти са сравнени в таблица 22.

Таблица 22: Морфохимични характеристики на покритията от сажди и експериментално определени температурни градиенти.

Sample №	Morphology and chemical treatment	Soot size	O (at.%)	R_{rms} (nm)	μ (nm)	ϕ (%)	h (μm)	Average $dT_{\text{glass-glass/soot}}$ (K)
1	pristine quasispherical	Particles ~50 nm	4.1	47	45	14	73	12 $\pm$ 0.55
2		Fragments ~60-100 nm	3.8	232	n/a	n/a	57	4.5 $\pm$ 0.55
3	pristine mixed	Aggregates >600 nm	3.5	403	101	15	16	6.6 $\pm$ 0.55
4								
5	pristine quasisquare							
6								
7	quasispherical_	Particles ~55-120 nm	5.5	42	45	9	28	5.2 $\pm$ 0.55
8	C ₂ H ₅ OH_FC	Fragments ~90-220 nm	5.4	392	n/a	n/a	26	4.3 $\pm$ 0.55
9	mixed_C ₂ H ₅ OH_FC	Aggregates $\geq$ 400 nm	5.1	558	154	24	18	4.4 $\pm$ 0.55
10								
11	quasisquare_C ₂ H ₅ OH_							
12	FC							

Няколко интересни взаимовръзки се установяват въз основа на резултатите посочени в таблица 22. Покритията с най-малък размер на частиците отдават топлинната енергия най-бавно (т.е., най-висок температурен градиент между непокрито стъкло-сажди), което може да се обясни с понижена излъчвателна способност и общия коефициент на топлообмен на саждите. Хидрофилните кислородни функционални групи засилват топлопроводимостта и въпреки че покритията от сажди със „смесена“ морфология са по-дебели от тези с квазиквадратна морфология, средното $dT_{\text{glass/soot}}$ е по-малко поради по-голямото окисление на повърхността (виж таблица 22). Ролята на кислородните атоми в преноса на топлина е видима и при сравняване на първичните и химически модифицирани покрития с квазиквадратна форма на агломератите от сажди (т.е. проби 5-6 и 11-12), където при относително еднаква дебелина на филма, повишената порьозност трябва да възпрепятства фононното движение, което не е реалният сценарий. Несъмнено дебелината на саждите регулира до известна степен фононното разсейване (сравнете проби 1-2/5-6 или проби 7-8/11-12), тъй като в монослойните графитоподобни

структури , акустичните фонони в равнината (LA-TA) и извън равнината (ZA) са добре отделени, но увеличаването на броя на монослоеве предизвиква ускорено разсейване на топлината между слоевете.

8. Основни изводи от глава IV

Глава IV обхваща изцяло или частично съдържанието на статии J5, J6, J7, J8, J9 и J10 (вижте списъка с публикации, включени в докторската дисертация) и разглежда задача 3.

Систематичните експериментални дейности описани в тези шест статии предоставят нови знания разкриващи, че постепенното понижение в повърхнинната температура на покритията от сажди под точката на оросяване предизвиква кондензация на водните пари чрез механизма на водородно свързване. Силите на привличане между отделните водни молекули улесняват адсорбцията на повече молекули под формата на верижна реакция и адсорбираните водни агрегати, разположени в зоните на кислородните атоми или точкови дефекти, увеличават своя обем и се опитват да се свържат един с друг, запълвайки макро- и мезопорите. Когато количеството на активните адсорбционни клетки е достатъчно малко, за да осигури непреодолимо разстояние между агломератите от сажди (при слабо окислени сажди, третиран с алкохол и перфлуорирани химикали), натрупаните пари създават локални области на свръхнасищане върху повърхността и захванатите водни молекули кондензират и кристализират бързо, оставяйки много зони върху покритието незаскрежени.

Това физическо явление води до наличието на малък брой „ледени мостове“ по повърхността, бавен топлопренос между падащи охладени водна капка и саждите, спомагайки за отскачането на капките дори когато неомокряемата повърхност е покрита с тънък слой скреж – уникален резултат, който не е документиран от нито една изследователска група в миналото. Когато алкохолно-флуоровъглеродната модификация се извършва върху силно окислени покрития от сажди, плътността на агрегатите от сажди и хидрофилните активни гнезда увеличава коефициента на триене между твърдата повърхност и капките, подобрява преноса на топлина и разсейва до голяма степен кинетичната енергия на капките, което ги „закотвя“ към повърхността. Неравномерното разположение на хидрофилните функционални групи може да спомогне за отскачането на капките дори върху заскрежени повърхности.

Правилното конфигуриране на покритията от сажди улеснява прецизната изработка на неомокряеми твърдотелни интерфейси съчетаващи едновременно биоадхезивни и ледофобни свойства, ограничавайки контакта между твърдотелната площ от повърхността и течността, гарантирайки възникването на механична деформация на микроорганизмите вследствие на „провисването им“ между микро- нанограпавините на повърхността и забавяйки фазовите преходи течност-твърдо тяло.

Замразяването на неподвижни водни капки върху тези специално проектирани покрития от сажди показва някои интересни взаимовръзки, противоречащи на общоустановените механизми за пасивната защита от обледеняване и обогатяващи знанията в тази научна област, тъй като е показано, че образуването на лед върху саждите зависи основно от техния химичен състав и дебелината на филма, а не от размера на частиците, поръзността, хистерезиса на контактния ъгъл, грапавостта на повърхността и степента на неомокряемост. Когато охлаждането на водните капки и охладителната платформа се случва едновременно, вместо конвенционалното замръзване на контактната линия се наблюдава първоначално обледеняване включващо цялостната обвивка на течността, което е хибридна версия на известния режим на замръзване „отвън-навътре“.

Такъв рядкосрещан режим на замразяване може да бъде проследен с помощта на пиезорезонансни устройства, чийто сензорен сигнал се използва за изчисляване на дебелината на ледената обвивка, характеризираща се с по-слаба адхезия в сравнение със случая на обменно замръзване. Това наблюдение е доста любопитно и може да се обясни с процесите на топлопренос в обема на покритията от сажди. Там, в противовес на механизмите на топлообмен на границата твърдо-течно, разпространението на топлинна енергия се управлява от фононно разсейване от стените и повърхността на порите, и разстоянието между монослоевите от сажди в покритието, повлияно от третирането с различни в алкохоли.

ГЛАВА V: КОГАТО ФИЗИКАТА НА КОНДЕНЗИРАНАТА МАТЕРИЯ СРЕЩНЕ БИОЛОГИЯТА: ИЛИ КАК ОТПАДЪЧНИ САЖДИ МОГАТ ДА СЕ ИЗПОЛЗВАТ В КРИОБИОЛОГИЯТА И РЕПРОДУКТИВНАТА МЕДИЦИНА

1. Мотивация

Без излишна скромност, и напълно уверено, може да се каже, че криобиологията е научно направление представляващо съвременен Ноев ковчег, тъй като знанието, което разпространява прави технически осъществимо краткосрочното и дългосрочното съхранение на буквално всякакъв вид жива материя, заедно с нейното междуконтинентално, а защо не и междуплантарно, транспортиране ако програмата SpaceX на Илон Мъск успее.

Наистина е удивително, че човешкото тяло, включително мозъкът, не може да оцелее при криогенни температури, което в момента възпрепятства дългогодишната мечта за замразяване на хора в течен азот и по-късното им връщане към нормален живот, но междувременно изолирани части от това тяло, като клетки, тъкани и органи, могат да бъдат запазени благодарение на ниските температури.

Причините са изчерпателно обяснени от Питър Мейзър, Дейвид Пег и сътрудници, които формулират няколко, с право наречени класически, механизми на криоувреждане, включително факта, че съставните клетки на тъканите/органи са по-плътно разположени от тези в лабораторните клетъчни суспензии и техните различни размери и геометрия изискват различни криопротоколи за оптимално съхранение. Дори извънклетъчният лед е фатален за живата материя ако е в рамките на биологичната система, която трябва да бъде замразена, тъй като този тип кристализация може да промени адекватното разположение на клетките и техните взаимовръзки, заедно с целостта на неживите междуклетъчни структури.

Краткосрочното и/или дълготрайно съхранение на живи клетки става практически възможно през 1949 г., когато Крис Полдж, Одри Смит и Алън Паркс откриват случайно защитната функция на глицерола, тъй като използват бутилка съдържаща 10% глицерол и 1% албумин, но неправилно етикетирана като фруктоза. Оттогава, успешната криоконсервация на биологична материя, включително сперматозоиди, се извършва предимно чрез криопротектанти на базата на глицерол, което засега се явява златен стандарт, улесняващи съхранението на човешки и животински гамети в случаи на нарушена сперматогенеза, лечение на безплодие с донорска сперма, автоложна

употреба, предстоящи опасни хирургични интервенции, смяна на пола или за подобряване на отглеждането на добитък и птици. Огромен и все още нерешен проблем остава токсичността на криопротективните агенти, тъй като пълната витрификация (изцяло без образуване на лед) включва 67 тегл.% глицерол. Ако се добави достатъчно количество витрифициращо разтворимо вещество, системата ще претърпи равновесна витрификация независимо колко бавно протича охлаждането и възстановяването няма да зависи от скоростта на размразяване. За съжаление, все още никой не е постигнал изцяло възстановена функционалност след бавно охлаждане и бавно затопляне, протичащи без ледообразуване на всеки етап от процеса. Така че основният въпрос и оттам научната мотивация тук е: Би ли било възможно да се криоконсервират човешки сперматозоиди чрез бавно охлаждане и затопляне на суспензията и да се постигне пълно възстановяване на първоначалните параметри на гаметите, като същевременно се избягва прекомерната употреба на криопротектанти?

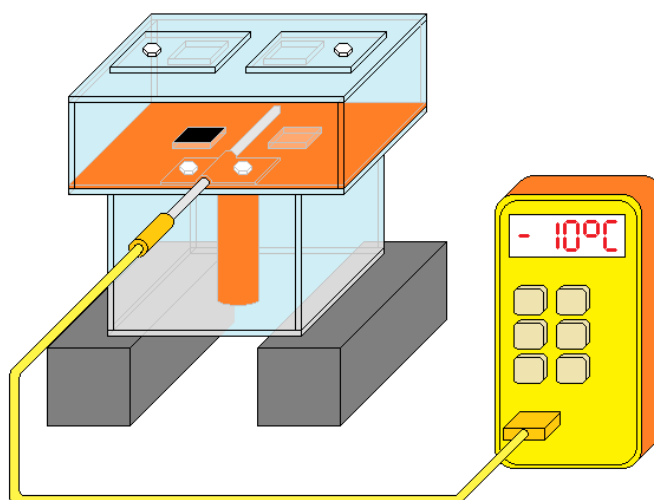
Тази глава „приема предизвикателството“ и описва високоинновативна (евтина и лесно реализируема) и новаторска технология за криоконсервация на човешка семенна течност чрез свръххидрофобни покрития от сажди. Читателите ще се запознаят с това как е замислена основната идея и какъв е ефектът на наночастиците от сажди върху жизнеспособността, окислително-редукционния потенциал и акрозомния статус на човешките сперматозоиди. Те също така ще разберат, че безвредното криосъхранение на мъжки гамети е възможно чрез коригиране на физикохимичните характеристики на избраните покрития от сажди.

2. Как покритията от свръххидрофобни сажди спомагат за по-добрата криоконсервация на човешки еякулат

Първоначалната хипотеза се основава на способността на свръххидрофобните материали да минимизират контактната площ на границата твърдо тяло-течност и да забавят скоростта на топлопренос, възпрепятствайки ледената нуклеация. Предполага се, че саждите са приложими за криоконсервация на човешки еякулат, тъй като бавното замразяване на клетките е за предпочитане и фазовите преходи течност-твърдо тяло на свободната повърхност на капката и на контактната площ не протичат едновременно. Следователно се очаква балансирано замразяване на семенната течност без бързо дехидратиране и/или образуване на вътреклетъчни кристали. По време на фазата на размразяване, забавянето на скоростта на топлообмен може да предизвика бавен приток на вода в клетките, предотвратявайки осмотичния шок.

Първите опити се извършват с прясно отделен еякулат на трима здрави доброволци (35-55 години), разглеждани като пациенти *A*, *B* и *C*, след мастурбация и еякулация в стерилен пластмасов флакон. След втечняване на семенната течност, концентрацията и подвижността на сперматозоидите се определят чрез компютърен (CASA) анализ (софтуер Sperm Class Analyzer версия 6.0.0.2, Microptic S.L., Барселона Испания). Втечненият еякулат се смесва с криопротектант Sperm Freezing (Cooper Surgical, САЩ) в съотношение 1:0.7 об. % чрез добавяне на химикала на капки разбърквайки равномерно. Така приготвената смес се съхранява десет минути на стайна температура за темперирание, преди процедурите по замразяване/размразяване.

След като семенните суспензии се темперират при стайна температура, криоконсервацията на човешки сперматозоиди се извършва в домашно изработена камера от плексиглас, описана в раздели 2-4 на глава IV и скицирана на фигура 48.



Фигура 48: Схема на експеримента.

Двойка непокрита и покрита със сажди стъклени подложки се поставят в камерата и две 50 μL капки от смес еякулат-криопротектант се отлагат върху тяхната повърхност. След установяване на термодинамично равновесие (по-малко от 0.3 °C температурен градиент между температурата на околната среда и тази в камерата), медният прът се потапя в течен азот и пробите се охлаждат със скорост ~ 2.5 °C / min. Извършва се бавно замразяване на сперматозоиди за 15 минути, последвано от постепенно размразяване със скорост на нагриване ~ 1.7 °C/min. Подвижността на размразените сперматозоиди се оценява отново с помощта на CASA, като този подход се повтаря в два независими експериментални цикъла в два последователни дни и за тримата пациенти.

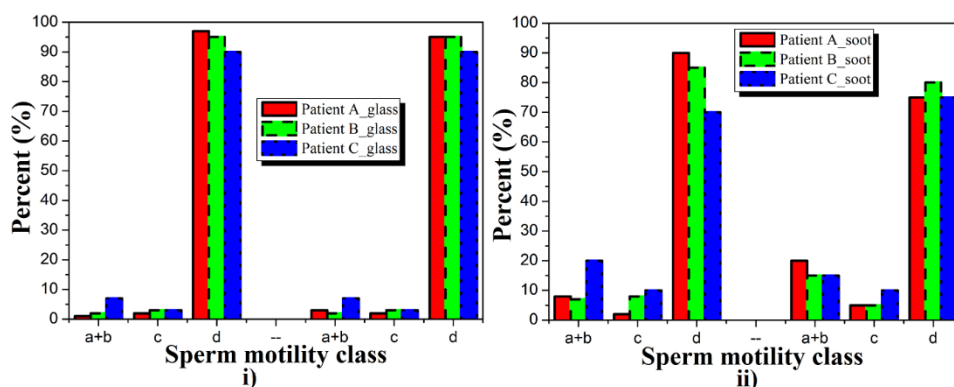
Таблица 23 показва параметрите на втечения еякулат на всеки доброволец преди криоконсервация.

Таблица 23: Параметри на втечената семенна течност на пациенти *A*, *B* и *C* преди криоконсервация.

Patient	Age	Conc. <i>C</i> (Mln/mL)	Motile (type a+b+c) %	Progressively motile (type a+b) %	Non- progressive (type c) %	Immotile (type d) %
<i>A</i> _Day 1	35	60	70	50	20	30
<i>A</i> _Day 2		60	75	50	25	25
<i>B</i> _Day 1	55	120	40	30	10	60
<i>B</i> _Day 2		100	25	15	10	75
<i>C</i> _Day 1	45	20	70	60	10	30
<i>C</i> _Day 2		5	60	50	10	40

Въз основа на номенклатурата на Световната здравна организация (СЗО), избраните пациенти *A*, *B* и *C* отразяват три пословични медицински случая, а именно нормозооспермия, астенозооспермия и лека до умерена олигозооспермия. Въпреки че събраните данни от трима души изглеждат недостатъчни за количествена оценка със значително статистическо значение, наличието на три съществено различни семенни течности е предпоставка за недвусмислено валидиране на предложения авангарден подход, тъй като повечето техники за криоконсервация са неуспешни при ниски концентрации на сперматозоидите.

Фигура 49 и Таблица 24 разкриват първите успешни експерименти за криоконсервация на човешки сперматозоиди с помощта на свръххидрофобни материали.



Фигура 49: Статистическо разпределение на подвижността на размразените сперматозоиди след криоконсервация върху i) непокрито и ii) неомокряемо стъкло в два последователни дни (лява и дясна част на всяка картинка).

Таблица 24: Подвижност на човешки сперматозоиди след размразяване

Patient	Event	Surface Material	Motile (type a+b+c) %	Progressively motile (type a+b) %	Non-progressive (type c) %	Immotile (type d) %
A_Day 1	Freeze/Thaw.	Glass	3	1	2	97
		Soot	10	8	2	90
A_Day 2	Freeze/Thaw.	Glass	5	3	2	95
		Soot	25	20	5	75
B_Day 1	Freeze/Thaw.	Glass	5	2	3	95
		Soot	15	7	8	85
B_Day 2	Freeze/Thaw.	Glass	5	2	3	95
		Soot	20	15	5	80
C_Day 1	Freeze/Thaw.	Glass	10	7	3	90
		Soot	30	20	10	70
C_Day 2	Freeze/Thaw.	Glass	10	7	3	90
		Soot	25	15	10	75

Независимо от пациента, саждите подпомагат оцеляването на от 3 до 5 пъти повече подвижни сперматозоиди в сравнение с непокрито стъкло. Свръххидрофобната повърхност възстановява ~80% от първоначалната подвижност на сперматозоидите на пациент *B* (съпоставяне на таблици 23-24), което е по-висока ефективност в сравнение с методи използващи съотношение 1:1 на сперматозоиди към криопротектант.

3. Свръхнеомокряеми въглеродни сажди като функционален активатор на човешки сперматозоиди

Успешното криоконсервиране на човешки сперматозоиди чрез свръххидрофобни покрития от сажди беше демонстрирано в предишния раздел, но представената технология подлежи на умерена критика, тъй като по-нататъшни експерименти, изясняващи влиянието на обема на течността, скоростите на замразяване/размразяване, вида на криопротектантите и повърхнинните характеристики на покритията са задължителни. Друг проблем, на който трябва да се обърне внимание, е дали саждите са цитотоксични, влошават ли репродуктивната активност на гаметите и причиняват ли оксидативен стрес и преждевременна акрозомна реакция, така че първите изследвания за цитотоксичност са обобщени по-долу.

3.1. Генериране на три вида сажди от рапично олио

За оценка на възможния цитотоксичен ефект, различни наночастици от сажди се генерират чрез регулация на скоростта на въздушния поток постъпващ в стоманен

конусовиден комин, изпълняващ ролята на горивна камера, в чиято основа е поставен метален съд с горящ хартиен фитил напоен с рапично олио. Три основни вида частици/агрегати от сажди с предвидимо променлива форма, размер, повърхностно окисление и зета потенциал, класифицирани като *soot1-soot2-soot3*, се отлагат като покрития върху серия от микроскопски стъклени подложки при стойности на въздушния поток от 0.0052 m³/min, 0.0042 m³/min и 0.0033 m³/min и се съхраняват в стерилни Петриеви съдове преди понататъшна употреба.

3.2. Анализ на цитотоксичността

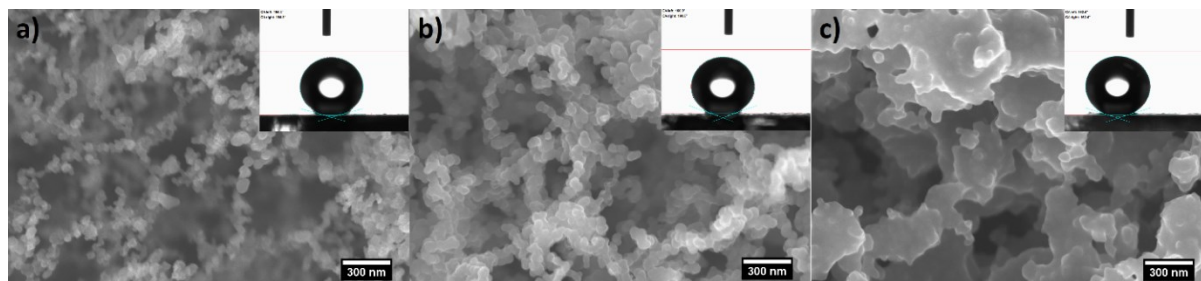
Двадесет пациенти с влошени параметри на еякулата или произхождащи от двойки с идиопатично безплодие (отнася се за медицинско състояние, при което клиничният преглед не разкрива конкретна патология обясняваща невъзможността за постигане на бременност) са избрани като представители на мъжкия фактор на безплодие. Техните нативни еякулати се отделят чрез мастурбация в стерилни пластмасови чашки след 24-120 часа сексуално въздържание. След втечняване, концентрацията и подвижността на сперматозоидите се идентифицират и записват с помощта на CASA софтуер. Всяка втечнена семенна течност се разделя на три (при девет пациенти) или четири (при единадесет пациенти) равни части и се поставя в пластмасови флакони чрез механична микропипета. Покритията от сажди се отстраняват внимателно от предметните стъкла и 1000 ppm прахообразни сажди (два или три вида, в зависимост от броя на аликутите) се смесват един по един с човешкия еякулат съдържащ се във флаконите (напр. 200 µg сажди разпределени в 200 µL еякулат), докато останалият флакон без сажди служи за контрола. Готовите суспензии от клетки и сажди се разбъркват и се инкубират при $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ и $RH \sim 98\%$ и кинетиката на цитотоксичност (ако се прояви) се изследва на всеки 90 минути, докато се забележат повече от 90 % неподвижни сперматозоиди в контролната проба в сравнение с нейното първоначално състояние.

Обосновката на тази експериментална постановка е свързана с неочакваното активиране на подвижността на сперматозоидите, забелязано по време на анализите включващи два крайно различни класа въглеродни наночастици, мотивирайки включването на трети „междинен“ модел сажди.

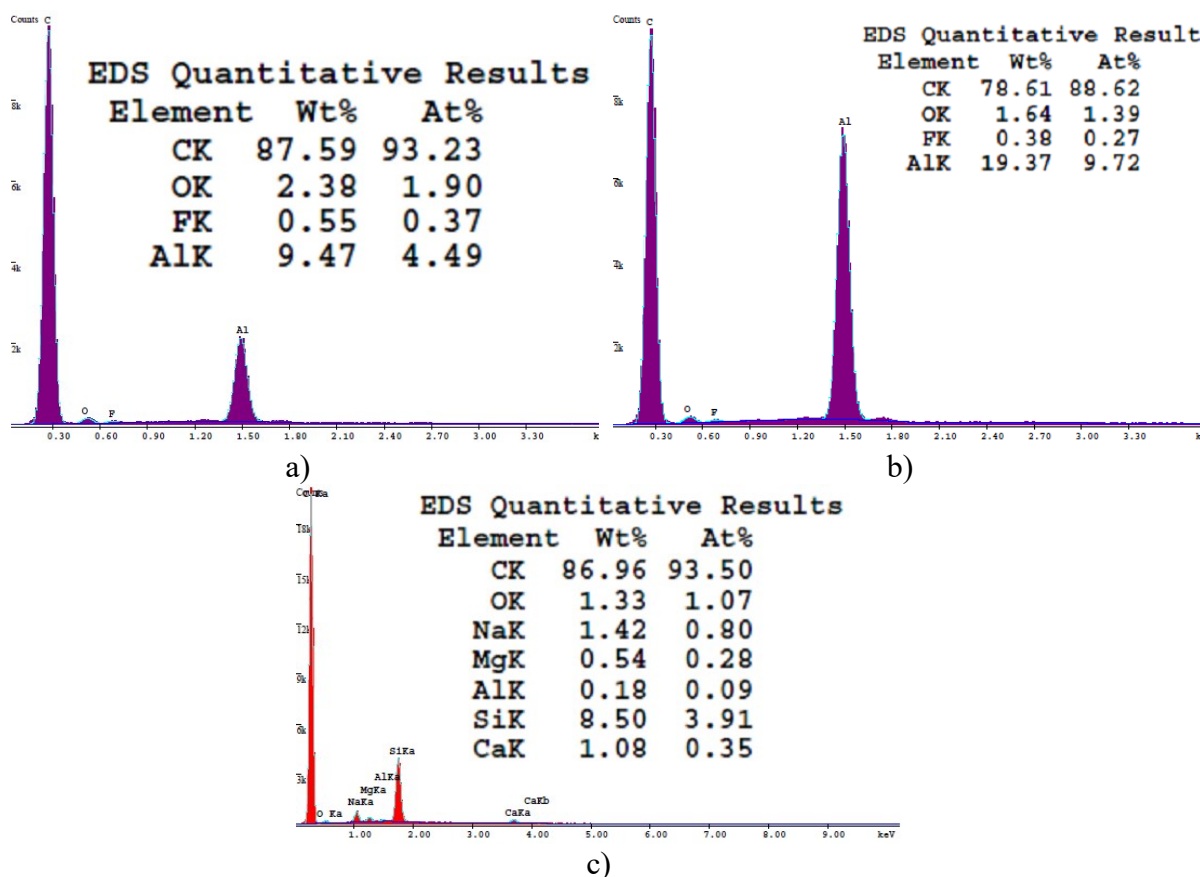
3.3. Физикохимични особености на наночастиците от въглеродни сажди

Контролираното горене на растителни масла е добре изучен метод предлагащ евтино, лесно и едноетапно производство на неомокряеми сажди с добре известни

физикохимични характеристики. Поради това, морфохимичните характеристики показани на фигури 50-51 ще се коментират накратко с цел да послужат като еталон при тълкуване на въздействието на тази група наночастици от сажди върху подвижността на сперматозоидите.



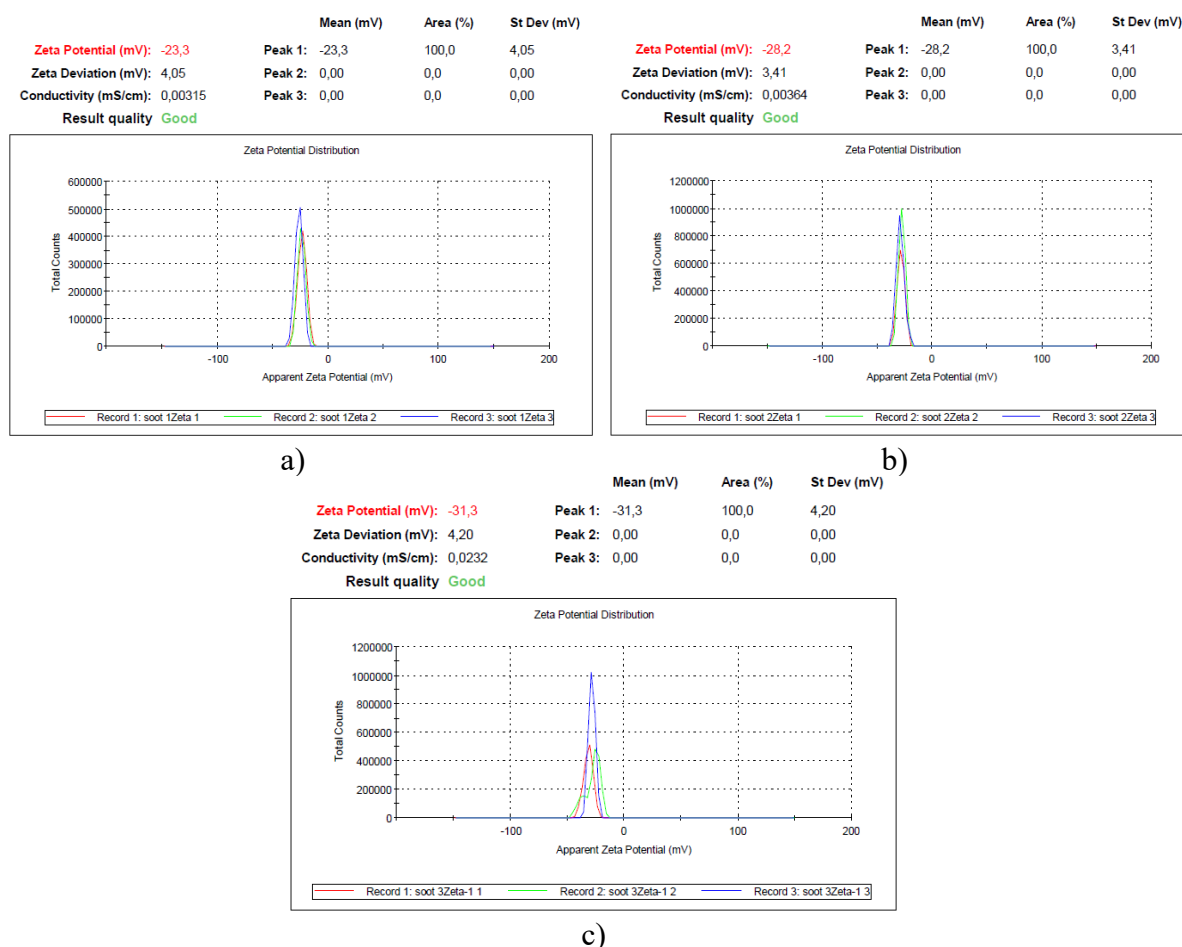
Фигура 50: Структура и морфология на саждите образувани при скорости на въздушния поток от а) $0.0052 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot1*, б) $0.0042 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot2* и в) $0.0033 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot3*. Въмкнатите фигури показват статичния контактен ъгъл на $10 \mu\text{L}$ водни капки поставени върху всеки вид покрития от сажди.



Фигура 51: EDS спектри на сажди образувани при скорости на въздушния поток от а) $0.0052 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot1*, б) $0.0042 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot2* и в) $0.0033 \text{ m}^3/\text{min}$ – *soot3*. Наличието на химични елементи като Na, Mg, F, Si и т.н. се дължи на химичния състав на стъклените подложки Biosigma VBS655/A.

Постепенното понижение в скоростта на въздушния поток предизвиква превръщане на конвенционалните фракталоподобни сферични сажди (фигура 50a) във въглеродни клъстери съставени от фрагментарни частици с неясни външни граници (фигура 50b) или напълно слети агломерати от сажди с квазиквадратна форма и липсващи граници между отделните частици (фигура 50c). Паралелно с морфологията се променя и химическата кинетика на зараждащите се въглеродни наночастици, което води до плавно понижение на количеството кислородни атоми в наноструктурите (фигура 51). Независимо от морфологията и химизма, всички образци са свръххидрофобни и притежават ъгъл на омокряне $\sim 160\text{--}164^\circ$ и хистерезис на ъгъла на омокряне $\sim 1\text{--}2^\circ$.

Тъй като човешките сперматозоиди са отрицателно заредени ($-16\text{ mV}/-20\text{ mV}$) и тяхната функционалност зависи от зета потенциала на клетъчната мембрана, който от друга страна влияе на цитотоксичността на различните наноматериали, измерването на повърхнинния заряд на саждите е задължителна изследователска стъпка, резултатите от която са показани на фигура 52.

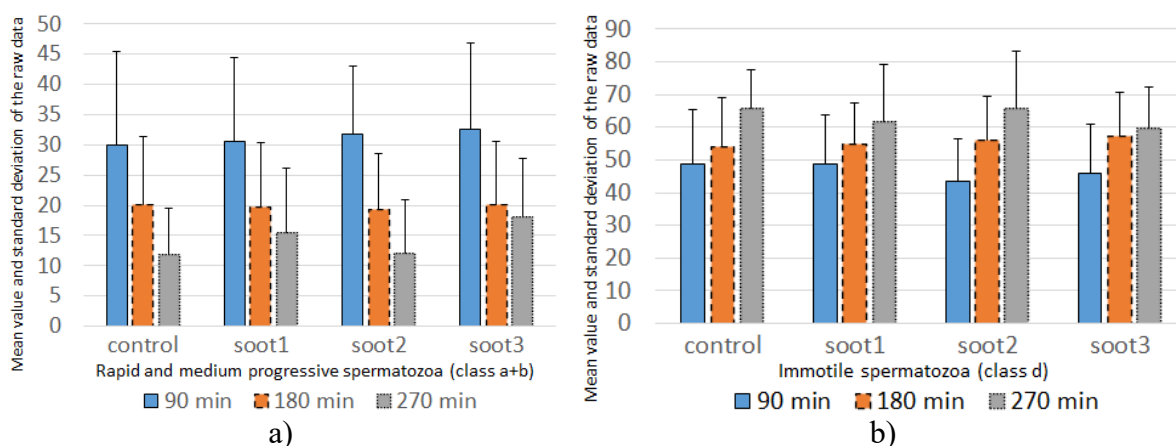


Фигура 52: Зета потенциал на саждите образувани при скорост на въздушния поток от а) $0.0052\text{ m}^3/\text{min}$ – *soot1*, б) $0.0042\text{ m}^3/\text{min}$ – *soot2* и в) $0.0033\text{ m}^3/\text{min}$ – *soot3*.

Колкото по-слабо е повърхностното окисление, толкова по-висок е отрицателният заряд на саждите от рапично олио (напр. 1.9→1.4→1.1 at.% O съответства на -23,3→-28,2→-31,3 mV), което не е в съответствие с повишения зета потенциал на силно окислени дизелови сажди. Въпреки това, повърхностният заряд на наночастици от TiO₂, например, е право пропорционален на тяхната специфична повърхност, което се смята и за причината, поради която най-големите агломерати от *soot3* (~1170 nm) са най-отрицателно заредени в сравнение с по-малките агрегати от *soot2* (~530 nm) и *soot1* (~180 nm).

3.4. Влияние на саждите от рапично олио върху подвижността на човешки сперматозоиди

Сърдечно-съдовите и респираторни заболявания са сред често срещаните здравословни проблеми при хора вдишвали аерозолни сажди, което е основа за справедливи медицински опасения относно последствията от всякакви взаимодействия на саждите с мъжките гамети по време на криоконсервация. Фигура 53 представя статистическия анализ на всички експериментални данни свързани с промените в подвижността на сперматозоидите на двадесет пациенти след 90 минути, 180 минути и 270 минути инкубация във флакони без и с различни модели на сажди.



Фигура 53: Средна стойност и стандартно отклонение на процента а) прогресивно подвижни и б) неподвижни сперматозоиди при двадесет пациенти, чийто еякулат е инкубиран със и без три вида сажди.

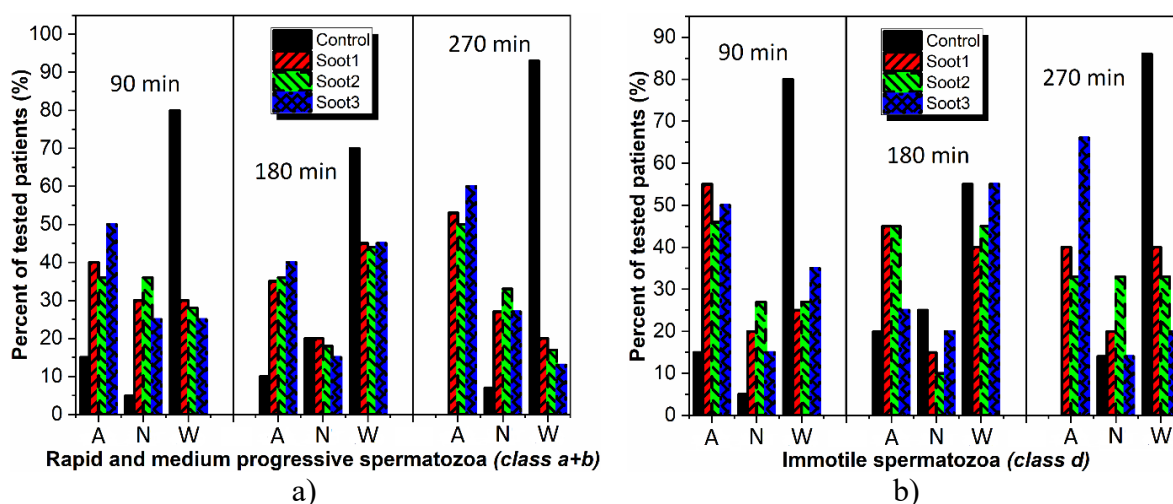
Средните стойности на данните показват, че семиналните суспензии смесени със *soot1* и *soot3* активират непрогресивните и неподвижни гамети, превръщайки ги в прогресивно подвижни сперматозоиди, но е интересен фактът, че липсва функционална активация на сперматозоидите в средния инкубационен период около 180 минути и

влошаване на прогресивната подвижност се регистрира при 80-85 % от пациентите, както е видно от Таблица 25.

Таблица 25: Процент на изследваните пациенти с прогресивно подвижни (class $a+b$) и неподвижни (class d) сперматозоиди в диапазона 30-50-70 %, след 270 min инкубация във флакони без (control – C) и с три вида сажди от рапично олио ($S1$ – soot1; $S2$ – soot2; $S3$ – soot3). Праговите стойности отразяват преходи между две диаметрално противоположни медицински състояния като нормозооспермия и астенозооспермия.

Motility class (%)	Percent of tested patients falling into the certain motility range											
	90 min				180 min				270 min			
	C	S1	S2	S3	C	S1	S2	S3	C	S1	S2	S3
$a+b \geq 50$	10	10	9	20	0	0	0	0	0	0	0	0
$30 \leq a+b \leq 50$	35	40	36	35	20	20	18	15	0	13	0	7
$a+b \leq 30$	55	50	55	45	80	80	82	85	100	87	100	93
$d \leq 50$	60	55	73	60	40	35	18	25	7	20	33	33
$50 \leq d \leq 70$	25	45	27	35	50	55	73	60	60	53	33	47
$d \geq 70$	15	0	0	5	10	10	9	15	33	27	33	20

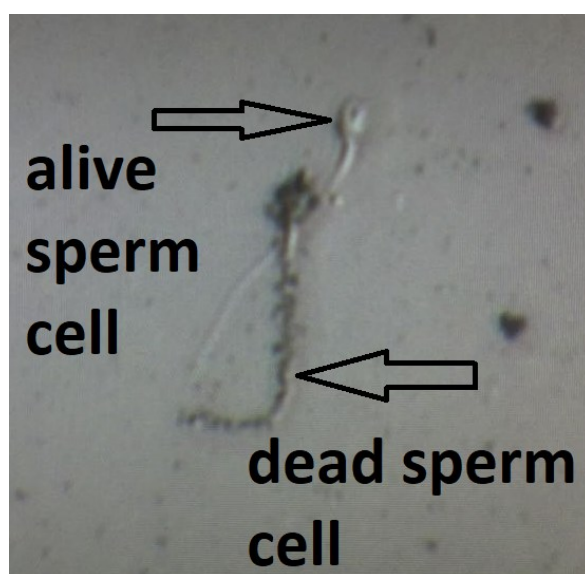
Въпреки всичко, таблица 25 не предлага информация за възможни изменения в качеството на семенната течност за пациенти с репродуктивни проблеми, т.е. при такива чиито гамети попадат в рамките на $a+b \leq 30$ % или $d \geq 70$ %. Наличието на подобни изменения трябва да бъдат внимателно анализирани с цел да се установи до каква степен саждите от рапично олио оказват активиращ, неутрален или цитотоксичен ефект – въпрос, който се изяснява до голяма степен от колонните диаграми на фигура 54.



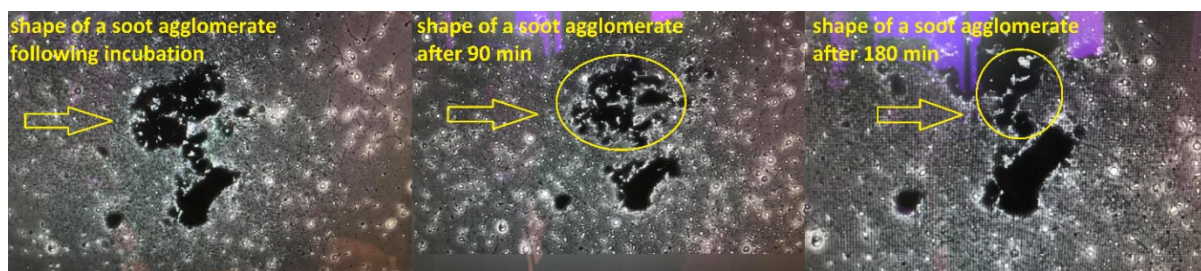
Фигура 54: Активиращ (A), неутрален (N) и цитотоксичен (W) ефект на саждите от рапично олио спрямо а) прогресивно подвижни и б) неподвижни човешки сперматозоиди в рамките на 270 min инкубационен период. Колонните диаграми

символизират процента изследвани пациенти, при които са наблюдавани конкретните ефекти (напр. $A=60\%$ – 270 min означава, че при 9 от общо 15 пациенти е регистрирана активация на подвижността).

Липсата на и/или много слабата цитотоксичност на този вид сажди се обяснява с факта, че отрицателният им зета потенциал отблъсква електростатично отрицателно заредените сперматозоиди, което предотвратява ендоцитозата (проникване на наночастици в клетъчната мембрана) и интоксикацията на клетките. От друга страна, електростатичните сили на отблъскване придават инерционен момент и кинетична енергия на мъжките гамети, което повишава тяхната криволинейна скорост – твърдения, които се доказват благодарение на фигури 55-56.



Фигура 55: Снимка на жив и мъртъв човешки сперматозоид в семинална суспензия обогатена със сажди.



Фигура 56: Разлагане и преоформяне на агломерат от неомокреями сажди след продължителен контакт с човешки сперматозоиди.

Живите сперматозоиди успешно възпрепятстват прилепването на сажди към тяхната глава, тяло и опашка, вероятно поради електростатично отблъскване, за разлика от мъртвите гамети изцяло покрити с въглеродни наночастици. Доколкото е известно, това е първото научно откритие на гореспоменатия феномен, което има висок потенциал да

бъде разработено в уникален метод за селекция на жизнеспособни сперматозоиди от нативни еякулати и тестикуларни биопсии в опит да се подобри резултатът от ин витро оплождането (IVF) и да се потисне мъжкият фактор на безплодие.

4. Биохимични изменения в човешка семинална плазма след инкубация с въглеродни сажди

Макар и доста достоверна, хипотезата за електростатично активиране не обяснява защо конкретните сажди действат като ускорител или забавител на подвижността в зависимост от пациента. Може би биохимичният състав на спермата играе роля в реакционните механизми и вероятно саждите абсорбират вредни съставки от семенната плазма (напр. простатната фракция, която е по-вредна за дългосрочното запазване на подвижността на спермата). Следователно, втората задължителна изследователска стъпка е подробен биохимичен анализ на набор от нативни еякулати преди и след добавянето на сажди, заедно с оценка на тяхната нанотоксичност в отсъствието на семинална плазма (за да може да се отделят електростатичните ефекти от тези, предизвикани от плазмата).

4.1. Биохимичен анализ на семинална плазма преди и след инкубация със сажди

Трите модела сажди от предишния раздел се отлагат директно върху стъклени подложки с размери 25×25 mm, след което се изстъргват и смесват поотделно с нативните еякулати на десет пациента. Критериите за подбор се основават на наблюдаваното подобрение в подвижността на човешките сперматозоиди както при мъже с нормално, така и при такива с влошено репродуктивно здраве. Изследването на биохимията на семиналната плазма на подобни пациенти, след смесване със сажди, и съпоставянето ѝ със съответните промени в подвижността на гаметите ще спомогне да се изяснят механизмите, чрез които въглеродните наночастици влияят на човешкия еякулат.

В първата част от изследването ~200 µg сажди (*soot1*, *soot2* или *soot3*) се суспендират в три флакона съдържащи 200 µL втечнени аликвотни части от еякулат, докато четвърта аликвотна част е предназначена за контрола. Напоените със сажди семенни течности се вортексират (което води до равномерно разпределение на наночастиците в обема на течността), инкубират се заедно с контролния образец за 270 минути ($T \sim 37^\circ\text{C}$ и $RH \sim 98\%$) и параметрите на еякулата се отчитат чрез компютърния софтуер. След инкубация, всички проби се центрофугират с помощта на микролитрова центрофуга Z 233 M-2

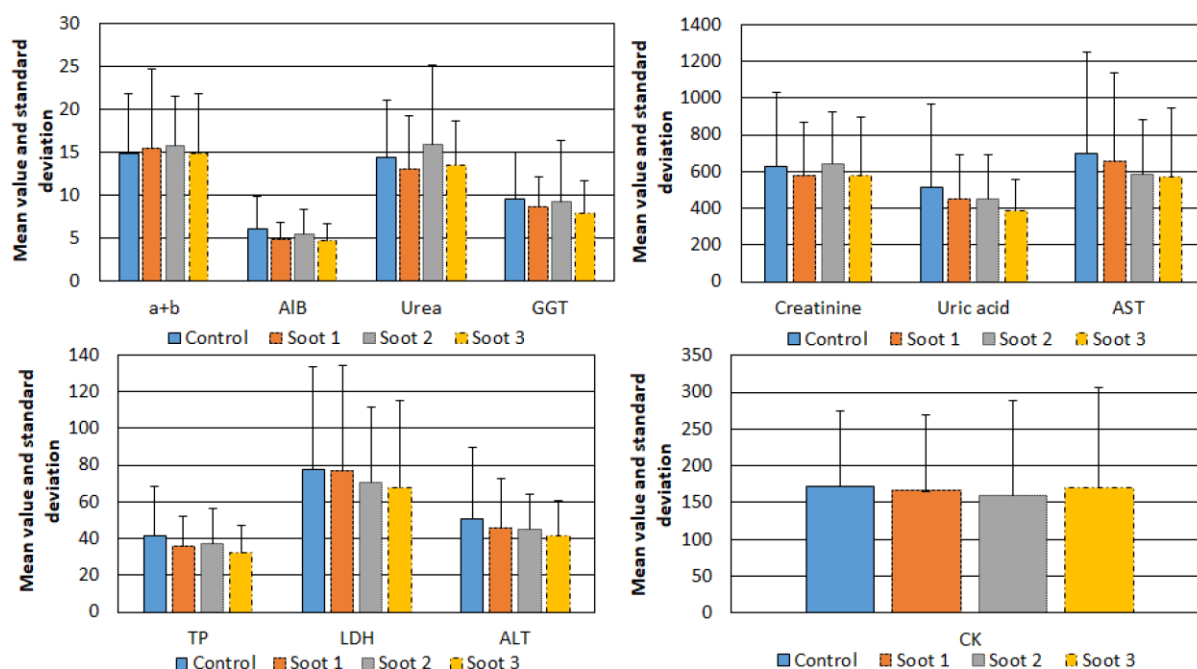
(HERMLE LaborTechnik, Германия) за ~10 минути и при утаяване на сперматозоидите, всяка семинална плазма се извлича внимателно с пипета. След това се съхранява при $T \sim -20^{\circ}\text{C}$ преди биохимичния анализ извършен чрез размразяване на течността и повторното ѝ центрофугиране за ~10 min. Първоначално се анализират двадесет и две компоненти на семиналната плазма, но само десет от тях (напр. общ протеин – TP, албумин – Alb, урея, креатинин, пикочна киселина, аспартат и аланин аминотрансферазни ензими – AST/ALT, лактат дехидрогеназа – LDH, креатин киназа – CK и гама-глутамил трансептидаза – GGT) се асоциират с измененията в подвижността на сперматозоидите, въз основа на изчисления коефициент на Spearman r_s .

Във втората част на изследването, семенната течност на други девет доброволци се анализира чрез компютърен софтуер, както е описано по-горе. Всеки еякулат се разделя на пет аликвотни части и първата се използва като контрола (сперматозои в семинална плазма). За да се елиминират неблагоприятните ефекти на семеногелините върху подвижността на сперматозоидите, другите четири проби се центрофугират за ~10 минути и надутайката се отстранява. Утаените гамети се ресуспендират в 1 mL разтвор SpermWash (Gynotec, Холандия) и наночастиците от сажди се вмъкват в три от четирите останали аликвоти. Последната аликвота е втора контрола (т.е. сперматозоиди в среда SpermWash без сажди) и подвижността на сперматозоидите във всички проби се проследява през интервал от 90 минути.

4.2. Биохимичен състав на човешка семинална плазма след инкубация с въглеродни сажди от рапично олио

Според данните на фигура 57, повишената и/или постоянна прогресивна подвижност (*class a+b*) се свързва с понижени стойности на повечето биохимични компоненти в семенната течност, вероятно поради блокиране на ензимната активност или сорбция на ензим-субстратните комплекси. Появата на взаимодействия сажди-ензим в семиналната плазма може да бъде проверена статистически чрез числовите стойности на коефициента на рангова корелация (r_s) на Spearman, показан в таблица 26. Установените отрицателни корелации от фигура 57 (т.е. по-добра подвижност на сперматозоидите, придружена от по-слаба ензимна активност) се потвърждават от стойностите на r_s . От особен интерес е групата биохимични показатели намаляващи своите стойности след инкубацията със сажди, тъй като се разкрива влиянието на въглеродните наночастици върху ензимната активност и техните молекулни партньори. Ензимната активност в семенната плазма остава незасегната от *soot2*, което подсказва защо това вещество

подобрява подвижността на сперматозоидите при по-малко от 50% от изследваните пациенти – просто по някаква причина (все още неизвестна) не взаимодейства с ензимите налични в плазмата. Р-стойности по-ниски от 0.05 несъмнено потвърждават, че нулевата хипотеза (т.е. липса на значима корелация между ензимната активност и подвижността на сперматозоидите) трябва бъде отхвърлена.



Фигура 57: Средна стойност и стандартно отклонение на данните отразяващи прогресивно подвижните сперматозоиди (*class a+b*) и биохимията на десет пациенти, чиято семенна течност е смесена със сажди за 270 min.

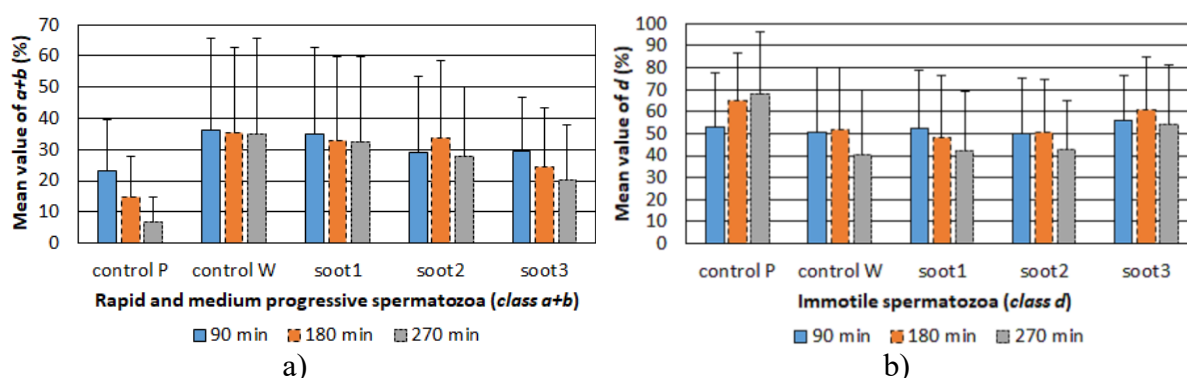
Таблица 26: Корелации (коефициент r_s) между биохимичните показатели на семенната течност и подвижността на сперматозоидите след инкубация със сажди.

Червените и сини цветове показват, съответно, положителна или отрицателна корелация. Нормалният шрифт означава липса на асоциация между данните.

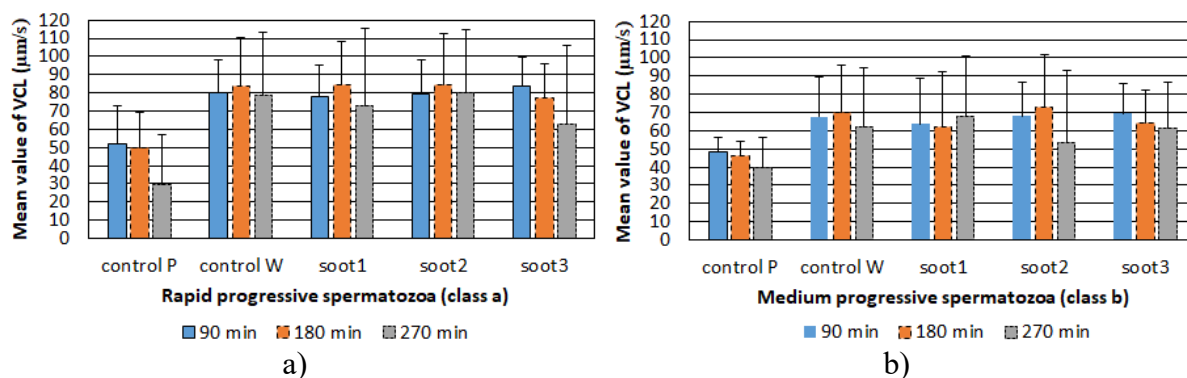
Component	Progressive sperm motility (<i>grade a+b</i>) %							
	r_{sK}	p-value	r_{sSoot1}	p-value	r_{sSoot2}	p-value	r_{sSoot3}	p-value
TP (g/l)	-0.28	0.02	-0.08	0.01	-0.05	0.004	-0.22	0.007
Alb (g/l)	-0.17	0.03	-0.25	0.009	-0.09	0.003	-0.18	0.003
Urea (mmol/l)	0.08	0.4	-0.23	0.3	0.1	0.5	-0.1	0.4
Creatinine (μ mol/l)	-0.43	0.001	-0.27	0.003	-0.04	0.001	-0.39	0.001
Uric acid (μ mol/l)	-0.15	0.007	-0.05	0.005	0.03	0.004	-0.18	0.001
AST (U/l)	0.08	0.004	-0.33	0.003	0.04	0.003	-0.24	0.002
ALT (U/l)	0.08	0.02	-0.3	0.01	0.03	0	-0.38	0.003
LDH (U/l)	0.18	0.002	-0.27	0.003	-0.04	0	-0.36	0.002
CK (U/l)	0.12	0.001	-0.07	0.002	-0.05	0.006	-0.43	0.006
GGT (U/l)	0	0	-0.3	0.01	0.03	0.002	-0.11	0

4.3. Ефект на наночастиците от сажди върху подвижността на човешки сперматозоиди в отсъствие на семинална плазма

От научна гледна точка е много важно да се разбере дали саждите от рапично олио могат да манипулират функционалния статус на човешките сперматозоиди след отстраняване на семиналната плазма – първо по рода си изследване, представено на фигури 58-59.



Фигура 58: Средна стойност и стандартно отклонение на процента а) прогресивно подвижни и б) неподвижни сперматозоиди на девет пациенти, чиято семинална плазма е била премахната. *Control P* и *Control W* са две контроли включващи сперматозоиди суспендирани, съответно в семинална плазма или SpermWash в отсъствие на сажди.



Фигура 59: Средна стойност и стандартно отклонение на криволинейната скорост (VCL) на а) бързо подвижни и б) средно-бързо подвижни сперматозоиди на девет пациенти, чиято семинална плазма е била премахната. *Control P* и *Control W* са две контроли включващи сперматозоиди суспендирани, съответно в семинална плазма или SpermWash в отсъствие на сажди.

Вижда се, че въпреки времето на инкубация, наличието на семинална плазма понижава криволинейната скорост и процента прогресивно подвижни сперматозоиди в сравнение с другите проби, тъй като тя се състои от естествени инхибитори на подвижността, които се закрепват към повърхността на гаметите и възпрепятстват

техния двигателен капацитет. Подвижността на сперматозоидите в семиналната плазма е по-лошо спрямо тази на гаметите суспендирани в буфер SpermWash съдържащ сажди от рапично масло, което доказва, че този наноматериал не е цитотоксичен за човешката сперма. Въпреки това, в отсъствието на семенна плазма, прогресивната подвижност е леко влошена от саждите (вижте *Control W-Soot1-Soot2-Soot3* на фигура 58a), което означава, че двигателната способност на сперматозоидите се променя главно чрез биохимични, а не чрез физически механизми.

И все пак, пробите съдържащи сажди със сферична и „смесена“ морфология (*soot1-soot2*) се характеризират с по-нисък процент неподвижни (*class d*) сперматозоиди в сравнение с пробите *control W* след 180 минути инкубация (вижте Фигура 59b). Въпреки че процентът на праволинейно движещи се сперматозоиди е малко по-нисък, общият мотилитет (*class a+b+c*) остава по-висок благодарение на саждите. От друга страна, VCL на бързо и средно-бързо подвижните сперматозоиди третирани със сажди се увеличава в определени интервали от време (напр. за *class a* – със *soot3* на 90 минути, със *soot1/soot2* на 180 минути и със *soot2* на 270 минути; за *class b* – от *soot2/soot3* при 90 минути, от *soot2* при 180 минути и от *soot1* при 270 минути), потвърждавайки, че механизмът за активация съдържа и физическа основа. Като основно заключение, регулираното от саждите подобрене в подвижността на сперматозоидите е по-ефективно в присъствието на семинална плазма поради появата на биохимични взаимодействия.

5. Окислително-редукционен потенциал и акрозомен статус на човешки сперматозоиди след инкубация със сажди от рапично олио

Химически неполярните сажди от рапично олио осигуряват бинарен механизъм за подобряване подвижността на сперматозоидите, но техните кислородни функционални групи е възможно да отделят свободни кислородни радикали, известни също като реактивни кислородни видове (ROS), и да причинят оксидативен стрес пагубен за мъжките гамети. ROS може да модифицират ненаситените мастни киселини, разположени около клетъчната мембрана, и да причинят фрагментация на ДНК-то на сперматозоидите, което от своя страна може да забави скоростта на бластулация (ранно развитие на ембриона) и да увеличи риска от спонтанен аборт. Дори ако това не е реалистичен сценарий, този вид сажди е възможно да разкъсат свързаната с мембраната органела (акрозома) при ин-витро обработване на сперматозоида, който след това няма да може да пробие външната обвивка на яйцеклетката (зона Пелуцида) и да я оплоди.

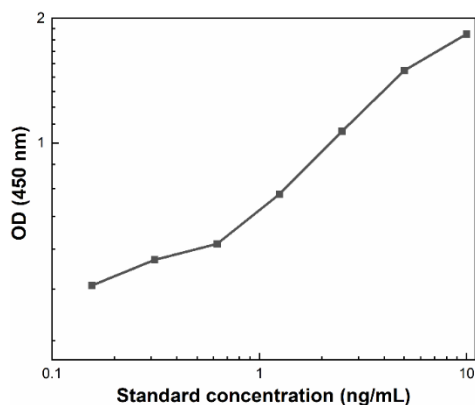
Това е съществен етап в репродуктивната биология и в случаите на интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (ICSI), наличието на вече акрозома-реагирани имобилизирани сперматозоиди във вътрешността на яйцеклетката ще бъде от полза за функционалната зрялост на гаметата и способността за оплождане на яйцеклетката. Ако третирането със сажди предизвиква хиперактивация (увеличаване на амплитудата на вибрациите на опашкатай, спомагайки за по-лесното проникване през зона Пелуцида), то гореописаната нанотехнология би била по-практична за класическо ин витро или инсеминация, където обработените сперматозоиди се поставят в малка капка на хранителна среда или в матката на жената, използвайки съответно катетър, и мъжките гамети сами могат да инициират акрозомна реакция и последващо естествено оплождане – съображения, които трябва да бъдат взети предвид в контекста на бъдещата клинична употреба.

5.1. Изследване на окислително-редукционния потенциал (ОРП)

Нативните еякулати на четирима пациенти се събират в стерилни пластмасови чашки чрез мастурбация и след тридесет минути престой в инкубатор, концентрацията и подвижността на сперматозоидите се отчитат чрез CASA софтуер. Двеста μg от три вида наночастици от сажди (т.е. притежаващи квазисферична, смесена и квазиквадратна морфология), означени като *soot1-soot2-soot3*, се поставят един по един в три флакона побиращи 200 μL втечнена семенна течност, докато четвърти флакон без сажди се оставя за контролен образец. Получените суспензии се инкубират за 180 минути при $\sim 37^\circ\text{C}$, центрофугират се при 2000 rpm за 5 минути и надутайката (семиналната плазма) се отстранява. Четирите семинални плазми и четирите аликвотни части от сперматозоиди се смесват с буферен разтвор на SpermWash (т.е. общо осем проби) и 30 μL капчици от всяка проба се поставят във входа на еднократни сензорни чипове с платинен електрод на аналитичното устройство MIOXSYS. Стойностите на ОРП се появяват на екрана в рамките на 2 минути, след което се преизчисляват по отношение на концентрацията на сперматозоидите във всеки еякулат, което гарантира наличието на тридесет и две стойности на ОРП за по-нататъшен анализ. Важно е да се спомене, че буферът не влияе на показанията на сензора, което е експериментално доказано чрез изследване на три буферни аликвоти със *soot1*, *soot2* или *soot3*, показващи еднакъв ОРП около $\sim 220\text{--}223\text{ mV}$.

5.2. Оценка на акрозомния статус на човешки сперматозоиди

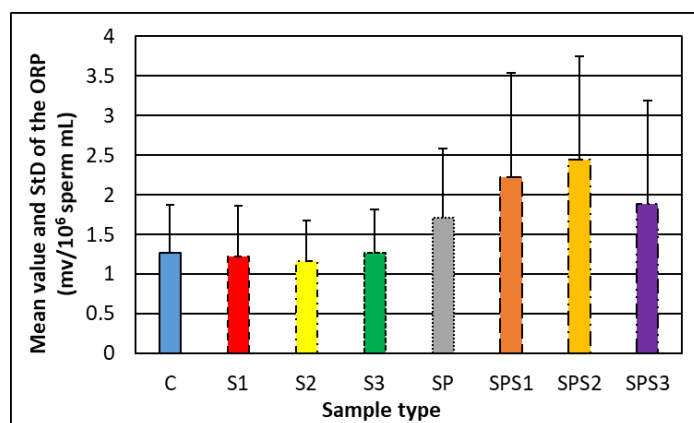
Изследванията се провеждат в съответствие с указанията на MyBioSource Inc., свързани с принципа на работа на Human Acrosin ELISA Kit. Втечненият еякулат на десет пациенти се подлага на компютърно анализ и след това се смесва с въглеродни сажди по същия начин, описан по-горе. StandardTM разтвор се разтваря с 1 mL Sample DiluentTM, който произвежда изходен разтвор с 10 ng/mL съдържание на акрозин. След 15 min темпериране на стайна температура се правят няколко серийни разреждания, за да се създаде т.нар. стандартна крива, където 0 ng/mL е чистият Sample DiluentTM, докато 10 ng/mL е най-високият StandardTM. Сто μL от StandardTM (всички серийни разреждания), контрола (семенна течност без сажди) и проби от сажди-еякулат (*soot1*, *soot2* и *soot3*) се поставят в микролитрова плака, чието дъно е предварително покрито с антитяло специфично за целевия антиген, запечатват се и се инкубират за 120 min при 37 °C. Течността във всяка ямка се отстранява без измиване и 100 μL от работния разтвор на Detection Reagent ATM се добавят в ямките, които отново се запечатват. След 60 min инкубиране при 37 °C, ямките се промиват три пъти с 300 μL Wash BufferTM. По-късно се добавят 100 μL работен разтвор на Detection Reagent BTM и след 60 min инкубиране при 37 °C, ямките се промиват пет пъти. Деветдесет μL от Substrate SolutionTM се поставят в ямките, плаката се инкубира за 15 минути и се добавят 50 μL от Stop Solution (сярна киселина) за да се прекрати реакцията ензим-субстрат. Последващите промени в цвета на пробите се измерват спектрофотометрично при дължина на вълната 450 nm, докато концентрацията на акрозин (определяща процента на преждевременно акрозомиралите сперматозоиди) се определя корелирайки оптичната плътност (OD) на пробите със стандартната крива, илюстрирана на фигура 60, и конвертиране на стойностите чрез софтуера MyCurveFit.



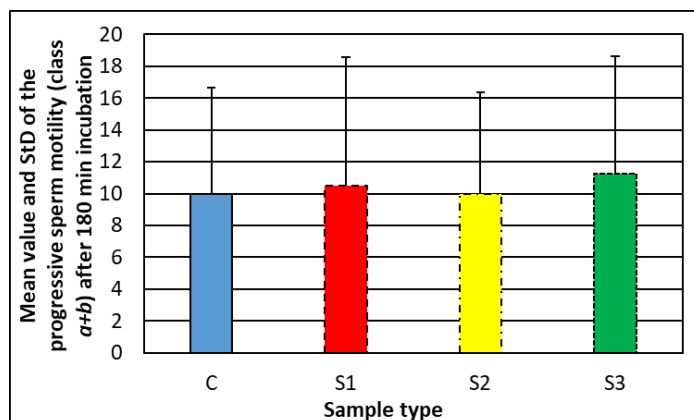
Фигура 60: Стандартна крива построена измерената оптична плътност на серийните разреждания от StandardTM.

5.3. Връзка между ОРП на семенната течност и характеристиките на саждите

Балансът между производството на кислородни молекули и тяхното навременно отстраняване от семенната течност смесена със сажди от рапично олио е ключът към предотвратяване на прекомерното отделяне на супероксиди, които се трансформират в свободни радикали и причиняват увреждане на митохондриите и други клетъчни структури. Фигури 61-62 онагледяват как наночастиците от сажди влияят върху подвижността на сперматозоидите и общата активност окислител-редуктор в гаметите и семиналната плазма на четирима пациенти.



Фигура 61: Средна стойност и стандартно отклонение на ОРП на контролни образци (сперматозоиди или семинална плазма без сажди) и такива инкубирани със сажди. Номенклатура: *C* – сперматозоиди без сажди (първа контрола); *S1*- сперматозоиди смесени със *soot1*; *S2* – сперматозоиди смесени със *soot2*; *S3* – сперматозоиди смесени със *soot3*; *SP* – семинална плазма без сажди (втора контрола); *SPS1* – семинална плазма смесена със *soot1*; *SPS2* – семинална плазма смесена със *soot2*; *SPS3* – семинална плазма смесена със *soot3*.

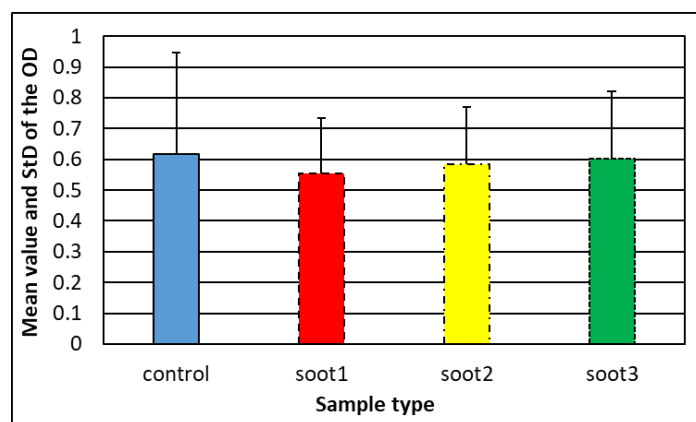


Фигура 62: Средна стойност и стандартно отклонение на процента прогресивно подвижни сперматозоиди след 180 min инкубация.

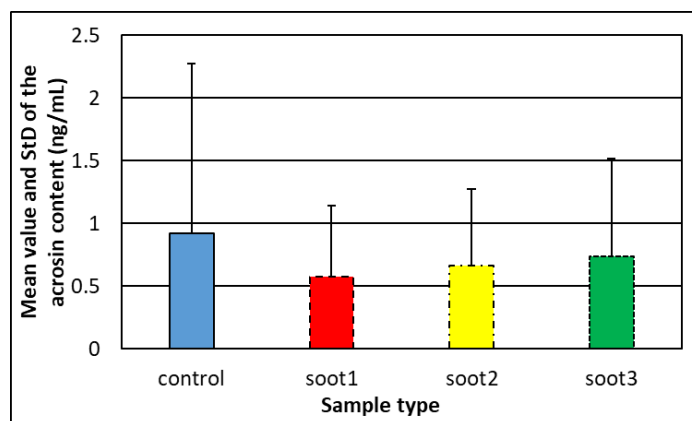
Забелязва се, че ОРП на мъжките гамети третирани със сажди не се различава съществено от този на контролните проби (виж фигура 61) и най-важното е, че всички стойности са под граничния диапазон ($1.38\text{--}1.41\text{ mV}/10^6$ сперматозоиди на mL), категоризиращ пациентите като безплодни с абнормални показатели на еякулата. Влошена окислително-редукционна активност се забелязва в семиналната плазма инкубирана със *soot1–soot2–soot3* в сравнение с втората контрола, което обуславя появата на някои интересни химични взаимодействия в еякулатите съдържащи сажди от рапично олио. Инкубационният период от 180 минути понижава прогресивната подвижност на сперматозоидите (виж фигура 62), която намалява до $\sim 10 \pm 1\%$ поради изчерпването на хранителните вещества в семиналната плазма.

5.4. Ефект на саждите от рапичн олио върху акрозомната реакция на човешки сперматозоиди

Акрозомната реакция е екзоцитозен процес водещ до обръщане на акрозомалната везикула и секреция на хидролитични ензими, създавайки „тунел“ в зона Пелуцида на яйцеклетката, през който сперматозоидът достига и преоформя плазмената ѝ мембрана. В зависимост от факторите задействащи акрозомната реакция, тя може да се случи спонтанно чрез повишаване на вътреакрозомното рН и съдържанието на Ca^{2+} йони или да бъде активирана от естествени индуктори като фоликулни течности, прогестерон и невротрансмитери. Целта тук е да се изясни дали саждите от рапично олио могат или не могат да действат като инхибитор на спонтанната акрозомна реакция, което е от решаващо значение за бъдещата приложимост на този наноматериал в репродуктивната медицина. Фигури 63–64 резюмират първите опити за анализ на акрозомния статус на човешки сперматозоиди след третиране с хидрофобни сажди.



Фигура 63: Средна стойност и стандартно отклонение на оптичната плътност на семенна течност без и със сажди след Human Acrosin ELISA Kit анализ.



Фигура 64: Средна стойност и стандартно отклонение на съдържанието на акрозин в семенна течност без и със сажди след Human Acrosin ELISA Kit анализ.

Получените експериментални резултати са много вълнуващи и неочаквани, тъй като средната ОП и съдържанието на акрозин в еякулатите инкубирани със сажди са по-ниски (като абсолютна стойност) в сравнение с контролите, което предполага, че тези въглеродни наночастици да имат способността да потискат спонтанната акрозомна реакция. Вероятността за статистическа разлика между отделните групи на Фигури 61-62-63-64, на база проведения Single Factor ANOVA тест, варира в рамките на $p = 0.58-0.86$, което безспорно потвърждава, че саждите от рапично олио не влияят неблагоприятно на окислително-редукционния баланс и акрозомален статус на мъжките гамети, което прави този наноматериал достатъчно надежден за използване в репродуктивната биология. Запазването на акрозомата непокътната избягва загубата на акрозомална ензимна активност при пръсване на “шапкоподобната” структура в женския генитален тракт, като по този начин увеличава шанса за успешно ин витро оплождане.

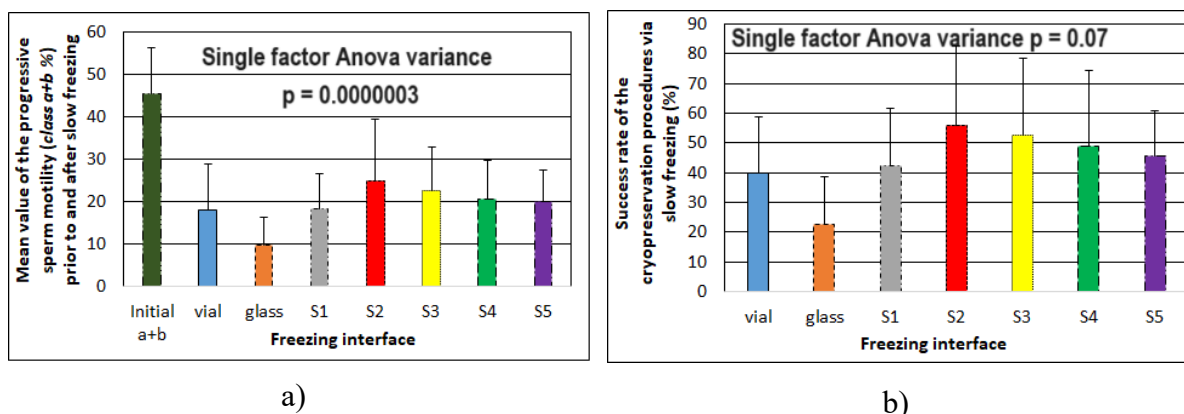
6. Връзка между физикохимичния профил на свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди, обема на еякулата и успеваемостта на бавната криоконсервация

Бидейки нецитотоксичен функционален активатор на човешки сперматозоиди, който не предизвиква оксидативен стрес и преждевременна акрозомна реакция, но същевременно забавя скоростта на топлообмен, намалява вероятността за ледообразуване и предизвиква балансирана и навременна дехидратация на клетките, саждите от рапично олио изпъкват като отпадъчен наноматериал, който отваря нова страница в историческото развитие на репродуктивната медицина и криобиологията и служи като полезна отправна точка за бъдещото оптимизиране на криогенни системи

предназначени за криоконсервация на жива материя. Едно от оставащите неизвестни е дали физикохимичните характеристики на покритията от сажди (т.е. морфология, химичен състав, грапавост и т.н.) и обемът на човешкия еякулат ще повлияят на резултата от бавното замразяване и размразяване.

6.1. Преживяемост на бавно замразени/размразени сперматозоиди в зависимост от профила на свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди

Покритията от сажди използвани в това изследване са добре известните вече сажди легирани със сребро, химически модифицирани и първични сажди с квазиквадратна морфология на частиците, покритие на основата на целулозен материал, цианоакрилат, флуоровъглерод и сажди, и мембрана на същата основа. Фигура 65 изяснява ролята на повърхнинния профил на свръххидрофобните покрития при потискане на двуфакторното увреждане от замръзване.



Фигура 65: Средна стойност и стандартно отклонение на а) процента прогресивно подвижни сперматозоиди на девет пациенти преди (*initial a+b*) и след бавно замразяване/размразяване и б) успеваемост на бавното замразяване чрез хидрофилни (vial, glass) и свръххидрофобни подложки покрити със сажди.

Средната прогресивна подвижност на сперматозоидите след размразяване е между 1.4-2.5 пъти по-висока при използване на сажди в сравнение с хидрофилните подложки (виж Фигура 65). Саждите осигуряват най-висок процент успеваемост при бавна криоконсервация, достигайки 56 % за покритията от целулозен материал (виж образец S2 на фигура 65b). Има видима връзка между механизмите на топлообмен, поддържани от покритията, и преживяемостта на човешките сперматозоиди, но би могло да се твърди, че 56 % възстановена подвижност на не е нещо впечатляващо, тъй като в литературата има данни за средна успеваемост от 69 %. За да се акцентира върху ползите от употребата на свръххидрофобни покрития от сажди за криоконсервация на

сперматозоиди, за предпочитане е внимателното изследване на необработените данни в таблица 27.

Таблица 27: Експериментални данни свързани с прогресивно подвижните сперматозоиди на девет пациенти, чиито семенни течности са били бавно замразени/размразени върху хидрофилни и свръххидрофобни подложки. В червено са отбелязани пациентите, при които подвижността е възстановена в рамките на 83-100 %.

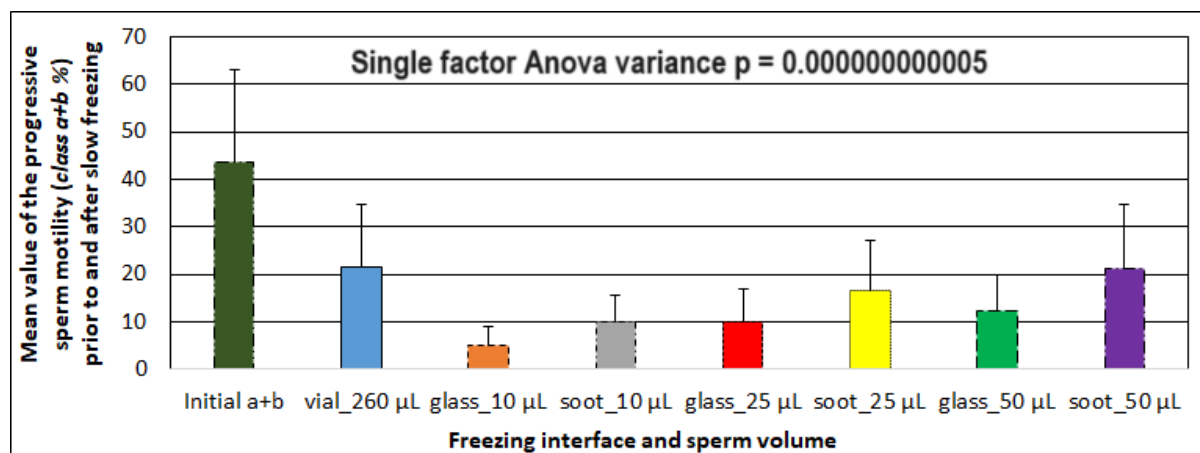
Patient	Progressive sperm motility (<i>class a+b</i> %) prior to and after slow freezing								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Initial <i>a+b</i>	36	56	53	44	55	22	38	56	48
vial	11	46	7	15	13	11	20	24	14
glass	3	5	4	8	17	6	22	5	17
S1	13	20	5	27	20	10	29	13	28
S2	11	55	12	29	22	12	32	13	40
S3	9	39	13	10	26	19	38	23	26
S4	11	33	9	17	25	18	38	20	15
S5	11	33	9	20	19	13	26	22	27

Очевидно при 44 % от изследваните пациенти (4 от 9) ефективността на технологията е над 80 %, докато при 2 от 9 доброволци се наблюдава пълно възстановяване (98-100%) на първоначалните параметри на сперматозоидите – резултат непостиган до този момент в световен мащаб.

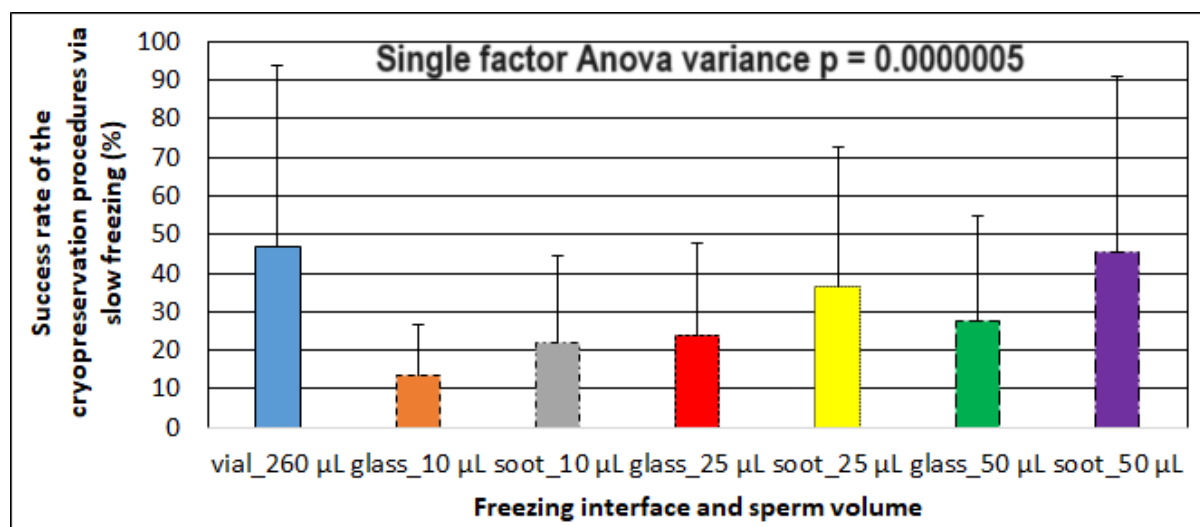
6.2. Ефект на обема на еякулата

В тази част от изследването целта е да се изследва влиянието на обема на еякулата върху преживяемостта на сперматозоидите след бавно замразяване/размразяване, провокирана от наличието на термични колебания и забавяне на топлината в определени области на по-големите течни обеми, отговорни за нарушена функция на живата материя след размразяване. Според данните на фигури 66-67, колкото по-голям е обемът на семенната течност, толкова по-висок е процентът оцелели гамети, което е изненадващо ако се има предвид възможната поява на топлинни изкривявания и докладваната в литературата липса на връзка между обемите на течността и кинематичните параметри на конски сперматозоиди след размразяване. Подобно на повърхнинния профил, и тук омокряемостта е ключов параметър и независимо от обема на течността, неомокряемият целулозен материал покрит със сажди спомага за по-доброто възстановяване на сперматозоидите в сравнение със стъклените подложки без покритие (виж фигури 66-

67). Изключение е хидрофилната криовиалка пълна с 260 μL семенна течност, която съдържа най-голям брой подвижни сперматозоиди, което потвърждава ефекта на течния обем върху резултата от бавното замразяване и размразяване.



Фигура 66: Средна стойност и стандартно отклонение на процента прогресивно подвижни сперматозоиди на осем пациенти преди (*initial a+b*) и след бавно замразяване и размразяване на различни обеми еякулат.



Фигура 67: Средна стойност и стандартно отклонение на успеваемостта на бавното замразяване и размразяване на различни обеми еякулат от осем пациенти.

7. Основни изводи от глава V

Глава V обхваща изцяло или частично съдържанието на статии J11, J12, J13, J14 и J15 (вижте списъка с публикации, включени в докторската дисертация) и решава задачи 4 и 5.

Резултатите описани в тази глава са здрава основа за напредък на Обществото по криобиология и медиците посветени на репродуктивното здраве, тъй като вече е

възможно бавно да се охлаждат и размразяват човешки семенни течности без да се влошават кинематичните параметри на мъжките гамети поради благоприятното въздействие на свръххидрофобните сажди. Този привидно безполезен и силно пренебрегван наноматериал потиска двуфакторното увреждане от замръзване, като намалява вероятността от образуване на лед, повишава термодинамичната свободна енергийна бариера на Гибс за фазови преходи течно-твърдо агрегатно състояние и по този начин спомага за предотвратяване на вредната реологична деформация на човешките сперматозоиди, предизвикано от прекомерно свиване на пълните с течност ледени канали в извънклетъчното пространство, хипертонично увреждане (повишена концентрация на разтворено вещество, причиняващо осмотичен шок) или смъртоносно вътреклетъчно заледяване. Забавеното образуване на ядра на лед позволява пасивно (без помощта на външен източник на топлина) и безвредно затопляне при стайна температура поради малките и еднородни ледени кристали образувани по време на етапа на замразяване и тяхната неспособност да прекристализират при размразяване.

Напълно неочаквано наночастиците от сажди имат положителен ефект и върху цялостната подвижност на сперматозоидите и действат като техен функционален активатор при продължителна инкубация в семинални суспензии. Това се случва чрез блокиране на изтичането на ключови регулаторни ензими като AST, ALT, LDH, CK и GGT от гаметите, вероятно чрез управлявани от сажди взаимодействия ензим-субстрат и/или чрез появата на електростатични отблъскващи сили между саждите и семенната течност, прехвърлящи двигателна енергия към гаметите и ускоряващи тяхната криволинейна скорост.

Продължителната инкубация на смес от семенна течност и сажди не оказва неблагоприятно влияние върху окислително-редукционния потенциал и акрозомния статус на човешките сперматозоиди, тъй като кислородните функционални групи на въглеродните наночастици неутрализират/стабилизируют оксидантите, произведени от мъжките гамети чрез водородни връзки и отдаване на електронни двойки към свободните радикали. Колкото по-високо е окислението на саждите, толкова по-добре се елиминира оксидативният стрес, придружено от запазване на непокътната акрозома. Отрицателният заряд на наночастиците от сажди благоприятства тяхното привличане към изолирани положително заредени области върху тялото на гаметите и стабилизира плазмената им мембрана.

ГЛАВНИ НАУЧНИ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Резултатите представени в тази дисертация отразяват нови научни постижения в изследванията на механизмите за пасивна защита от обледеняване и биозамърсяване въз основа на сажди от рапично олио, с пряко потенциално въздействие върху морския транспорт, корабостроителната индустрия, авиацията, репродуктивната медицина и криобиологията. По-голямата част от тези резултати разглеждат дизайна, оптимизирането и охарактеризирането на свръххидрофобни покрития от въглеродни сажди, доказвайки техните предимства и ефективност за възпрепятстване на микробната пролиферация при директно потапяне в соленоводни басейни и облекчаване на двуфакторното увреждане от замръзване по време на криоконсервация на човешка семенна течност. Приносите изброени по-долу са разделени на две части – първата част включва приноси, които са уникални по своята същност и разкриват съвсем нови перспективи в рамките на определена научна област, докато втората част включва приноси, които добавят значително нови знания към съвременното състояние на техниката.

Уникални научни приноси

1. Експериментално е установено, че омокрящите свойства на твърдотелния интерфейс играят ключова роля за успешното криосъхранение на жива материя, по-специално на човешки сперматозоиди. Преобразуването на повърхността в свръххидрофобна (свръхнеомокряема) придава присъщи криозащитни свойства на изразени отместване на точката на замръзване към по-ниски температури, потискане на вероятността за ледообразуване и регулиране на формата и размера на зараждащите се ледени кристали. Това отваря нови възможности за бъдещо безвредна криоконсервация на биологични системи без участието на проникваеми и непроницаеми криопротектанти.

2. Чрез инкубация при $T \sim 37^\circ\text{C}$ е доказано, че наночастиците от сажди, получени от горене на рапично олио, са нецитотоксични и могат да подобрят репродуктивния потенциал на човешките сперматозоиди чрез биохимично и електростатично активиране на тяхната подвижност, като същевременно поддържат окислително-редукционния баланс и цялостта на акрозомата на мъжките гамети. Този непостиган досега резултат е първа стъпка към постепенното отстраняване на относително вредните метилксантини, използвани за блокиране на разграждането на медиатора на движение на сперматозоидите – цикличния аденозин монофосфат, и замяната им с отпадъци от сажди – т.е. превръщането на един замърсител във функционален биоматериал.

Нови научни приноси

3. Разработена е неомокряема кварцова микровезна покрита с въглеродни сажди от рапично олио и е потвърдена нейната универсалност като сензор за анализ на човешка семенна течност и урина. Неомокряемият датчик е в състояние да разграничава по време фазите на постеякулаторна коагулация и втечняване на семенната течност, докато в случаите на анализ на урина, малки промени в биохимията на течността предизвикват значителни промени в междофазовата енергия на границата твърдо тяло-течност, позволявайки разпознаването на биохимични съединения и/или взаимодействия чрез промени в омокряемостта на твърдата повърхност. Този експериментално установен сензорен механизъм потвърждава патентованата хипотеза, че проследяването в реално време на различни биомолекулярни реакции е възможно, дори когато масата на целевия аналит е под прага на детекция (извън разделителната способност) на пиезорезонансния сензор.

4. Систематични експерименти разкриват, че покритията от сажди легирани със сребро и тези изградени от целулозен материал, цианоакрилат, флуоровъглерод и сажди са достатъчно механически устойчиви за да запазят повърхностния профил непокътнат за дълги периоди от време, като същевременно забавят пролиферацията и развитието на биофилм от различни Грам-отрицателни и Грам-положителни бактериални щамове, дори при разтваряне на захванатия между повърхностните грапавини въздушен слой в околната водна среда (т.е. при загуба на водоотблъскваща способност). Проявената селективност при антимикробната дейност на изследваните покрития разширява обхвата на тяхната практическа приложимост и подсказва, че саждите могат да се използват като медиатор на клетъчния растеж.

5. Експериментално е установено, че когато количеството на активните кислородни групи върху саждите от рапично олио е достатъчно малко, осигурявайки непреодолими разстояния между отделните агрегати от сажди, натрупаните водни пари създават свръхнаситени области на повърхността, оставяйки много нескрежени зони върху покритието. Това забавя топлообмена между падащите върху повърхността охладени водни капки и покритието от сажди, гарантирайки отскачане на капките дори когато покритието е покрито с тънък слой от скреж – явление, което не е наблюдавано досега и имащо потенциал да провокира бъдещата изработка на системи за възобновяема енергия издържащи на ледени бури.

6. Открит е нов режим на замръзване на водни капки по целия им контур, възникващ при едновременно охлаждане на криогенното съоръжение и водните капки. Този режим се характеризира с вледеняване на цялата обвивка на течността заедно с контактната линия на трите фази твърдо тяло, течност, въздух – хибридна и невиджана досега версия на известното замръзване „отвън навътре“, което има важни практически приложения свързани с изработването на композитни материали със седефоподобна структура чрез регулиране на местоположението и развитието на ледения фронт в капката.

Списък на публикациите включени в дисертацията

Публикации в списания с импакт фактор

- [J1] **K. D. Esmeryan**, G. S. Stamenov, T. A. Chaushev, An innovative approach for *in-situ* detection of postejaculatory semen coagulation and liquefaction using superhydrophobic soot coated quartz crystal microbalances, *Sensors & Actuators A Physical* **297** (2019) 111532. (IF = 4.1) Квартил Q1 през 2019 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=13660&tip=sid&clean=0>
- [J2] **K. D. Esmeryan**, T. A. Chaushev, Complex characterization of human urine using super-nonwetable soot coated quartz crystal microbalance sensors, *Sensors & Actuators A Physical* **317** (2021) 112480. (IF = 4.1) Квартил Q1 през 2021 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=13660&tip=sid&clean=0>
- [J3] **K. D. Esmeryan**, C. E. Castano, T. A. Chaushev, R. Mohammadi, T. G. Vladkova, Silver-doped superhydrophobic carbon soot coatings with enhanced wear resistance and anti-microbial performance, *Colloids & Surfaces A* **582** (2019) 123880. (IF = 4.9) Квартил Q1 през 2019 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=26589&tip=sid&clean=0>
- [J4] **K. D. Esmeryan**, T. A. Chaushev, Anti-biofouling potential of extremely water-repellent carbon soot coatings immersed in a highly-contaminated seawater swamp, *Progress in Organic Coatings* **183** (2023) 107719. (IF = 6.5) Квартил Q1 през 2023 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=13261&tip=sid&clean=0>
- [J5] **K. D. Esmeryan**, S. D. Gyoshev, C. E. Castano, R. Mohammadi, Anti-frosting and defrosting performance of chemically modified super-nonwetable carbon soot coatings, *Journal of Physics D Applied Physics* **54** (2021) 015303. (IF = 3.1) Квартил Q1 през 2021 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=28570&tip=sid&clean=0>
- [J6] **K. D. Esmeryan**, Critical aspects in fabricating multifunctional super-nonwetable coatings exhibiting icephobic and anti-biofouling properties, *Coatings* **11** (2021) 339. (IF = 2.9) Квартил Q2 през 2021 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100872725&tip=sid&clean=0>
- [J7] **K. D. Esmeryan**, S. Vargas, S. D Gyoshev, C. E. Castano, Water droplet bouncing on pre-frosted superhydrophobic carbon soot – a step forward in designing passive icephobic surfaces, *Diamond & Related Materials* **123** (2022) 108850. (IF = 4.3) Квартил Q2 през 2022 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=24680&tip=sid&clean=0>
- [J8] **K. D. Esmeryan**, C.E. Castano, S. D. Gyoshev, Y. Lazarov, N. I. Stoimenov, R. Mohammadi, On the dynamics of contact line freezing of water droplets on superhydrophobic carbon soot coatings, *Current Applied Physics* **31** (2021) 74-86. (IF = 2.4) Квартил Q2 през 2021 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=27477&tip=sid&clean=0>
- [J9] **K. D. Esmeryan**, N. I. Stoimenov, Studying the bulk and contour ice nucleation of water droplets via quartz crystal microbalances, *Micromachines* **12** (2021) 463. (IF = 3) Квартил Q2 през 2021 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100229176&tip=sid&clean=0>
- [J10] **K. D. Esmeryan**, T. Grakov, L. G. Vergov, Y. Lazarov, Y. Fedchenko, S. Staykov, Studying the thermal resistance of superhydrophobic carbon soot coatings for heat transfer

management in cryogenic facilities, *Applied Thermal Engineering* **219** (2023) 119590. (IF = 6.1) Квартил Q1 през 2023
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=13688&tip=sid&clean=0>

[J11] **K. D. Esmeryan**, Y. Lazarov, G. S. Stamenov, T. A. Chaushev, When condensed matter physics meets biology: Does superhydrophobicity benefiting the cryopreservation of human spermatozoa?, *Cryobiology* **92** (2020) 263-266. (IF = 2.3) Квартил Q1 през 2020
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=14864&tip=sid&clean=0>

[J12] **K. D. Esmeryan**, I. Rangelov, T. A. Chaushev, Hydrophobic soot nanoparticles as a non-cytotoxic motility activator of human spermatozoa, *Nanoscale Advances* **4** (2022) 2806-2815. (IF = 4.6) Квартил Q1 през 2022
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100928198&tip=sid&clean=0>

[J13] **K. D. Esmeryan**, I. Rangelov, T. A. Chaushev, Manipulated sperm motility via soot nanoparticles-induced biochemical alterations in human seminal plasma, *Reproductive Biology* **23** (2023) 100793. (IF = 2.5) Квартил Q1 през 2023
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=69085&tip=sid&clean=0>

[J14] **K. D. Esmeryan**, I. Rangelov, T. A. Chaushev, Oxidative stress and acrosomal status of human spermatozoa subjected to hydrophobic carbon soot treatments, *Nanomaterials* **14** (2024) 395. (IF = 4.4) Квартил Q1 през 2023
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100253674&tip=sid&clean=0>

[J15] **K. D. Esmeryan**, T. A. Chaushev, Cryopreservation of human semen by inherently-controlled icing probability: Or how the surface profile of superhydrophobic carbon soot coatings and the sperm volume affect the outcome of slow freezing?, *Cryobiology* **115** (2024) 104863. (IF = 2.3) Квартил Q2 през 2023
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=14864&tip=sid&clean=0>