

Ивалина Огнянова Трендафилова

**Разработване на нови модифицирани мезопорести
силикатни нанокompозити за контролирано
доставяне на лекарствени вещества**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

професионално направление 4.2. "Химически науки",
научна специалност "Органична химия"

Научни ръководители:
проф. д-р Маргарита Попова
проф. д-р Деница Момекова

София, 2018г.

Дисертационният труд съдържа 134 страници. Включва 58 фигури, 8 схеми и 11 таблици. Библиографията обхваща 281 заглавия.

Дисертационната работа е обсъдена и насочена за защита от обединено научно звено на колоквиум „Функционални материали, компютърно моделиране и технологии“ при Институт по органична химия с център по фитохимия към Българската академия на науките на 10.10.2018 г. Докторантът е зачислен на самостоятелна форма на обучение по професионално направление 4.2. „Химически науки“, специалност „Органична химия“ към ИОХЦФ-БАН.

Изследванията в дисертационната работа са извършени в:

- Лаборатория „Органични реакции върху микропорести материали“, Институт по органична химия с Център по фитохимия към Българска академия на науките
- Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“, Фармацевтичен факултет на Медицински университет София

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на ... в ...: часа в зала 111 „Богдан Куртев“ в ИОХЦФ-БАН, кв. „Гео Милев“, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9 на открито заседание на научното жури в състав:

1. Проф. д-р Маргарита Попова (ИОХЦФ, БАН)
2. Доц. дхн Георги Йорданов (ФХФ, СУ)
3. Доц. д-р Момчил Димитров (ИОХЦФ, БАН)
4. Проф. д-р Борис Шивачев (ИМК, БАН)
5. Доц. д-р Силвия Тодорова (ИК, БАН)

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ-БАН – стая 206, жк „Гео Милев“, ул. „Акад. Г. Бончев“, блок 9

Въведение:

Краткият полуживот, нежеланите странични ефекти и ниската разтворимост са едни от основните проблеми на редица лекарствени вещества. Това налага необходимостта от все по-интензивни изследвания в областта на разработването на нови лекарствени носители, позволяващи разрешаването на тези проблеми. През последните години разработването на нови и подходящо модифицирани мезопорести силикати с цел използването им като лекарствени носители бележи бурно развитие и понастоящем статиите в научната литература в това направление са над 5500. Възможността за повърхностно функциониране и контрол на морфологията и размера на частиците на мезопорестите силикатни материали ги прави изключително атрактивни за различни приложения в сферата на наномедицината и може да реши проблемите свързани с ниската ефективност на натоварване и бързото начално освобождаване на включеното лекарствено вещество от изходните силикати. Чрез подходяща модификация на повърхността на частиците с насочващи лиганди, може да се постигне активно доставяне на лекарствените вещества до прицелни органи, тъкани или субклетъчни функционални участъци, което значително намалява системните токсичните ефекти в здравите тъкани. Прицелното лекарствено освобождаване от мезопорестите силикатни носители може да осигури поддържане на терапевтичните концентрации в целевите тъкани за продължителен период от време. Поради малкия си размер мезопорестите силикатни наночастици имат способността да преодоляват биологичните бариери и по този начин могат да навлизат в клетките, което позволява ефективно доставяне на лекарственото вещество до клетъчните органели.

Лекарство-доставящите системи на основата на мезопорести силикатни материали могат да бъдат използвани за разработване на системи за контролирано доставяне и освобождаване на лекарствени вещества. Допълнително тези системи могат да разрешат и проблема с ниската водоразтворимостта на някои лекарствените вещества чрез тяхното фино диспергиране в порите на силикатния носител. Разработени са редица подходи за получаване на лекарство-доставящи системи с модифицирано освобождаване на основата на мезопорести материали, които осигуряват продължително освобождаване на лекарствено вещество поддържайки неговата терапевтична концентрация в целевия участък за дълъг период, което позволява да се намали както честотата на приемите, така и възможността за възникване на нежелани лекарствени реакции. Това се постига най-често чрез използването на полимери за обвиване на натоварените с лекарствено вещество силикатни носители. Нов тласък в разработването на лекарство-доставящи системи за противотуморни лекарства предоставят магнитни желязооксидни/силикатни мезопорести нанокompозити с различна структура, чието разработване като носители за лекарствени и диагностични средства започва през 2011 година. Чрез включването на магнитни нанокристали в мезопорести силикатни структури могат да се получат оригинални лекарство-доставящи системи, които позволяват селективното доставяне на лекарството до желан орган или тъкан в тялото, с помощта на външно магнитно поле и едновременното следене на поведението *in vivo* чрез използване на магнитно-резонансна техника за образна диагностика. За постигане на висока ефективност на тези системи е необходимо магнитните наночастици да имат сравнително малък размер, висока кристалност и висока стойност на магнитно насищане за осигуряване на максимален сигнал.

В заключение трябва да се отбележи, че уникалните свойства на мезопорестите материали, възможността за тяхното селективно модифициране, както и включването им в композитни материали откриват широки перспективи за разработване на ново поколение системи за контролирано доставяне и освобождаване на лекарствени вещества.

Цел на настоящия дисертационен труд е разработването на процедури за получаване на системи за контролирано доставяне на противовъзпалителни и противотуморни лекарствени вещества с орално, дермално или парентерално приложение на основата на нови модифицирани мезопорести силикатни наночастици с различна структура и модифицирани мезопорести магнитни желязооксидни/силикатни нанокomпозити.

За реализацията на поставената цел и на основата на направената литературна справка са формулирани следните задачи:

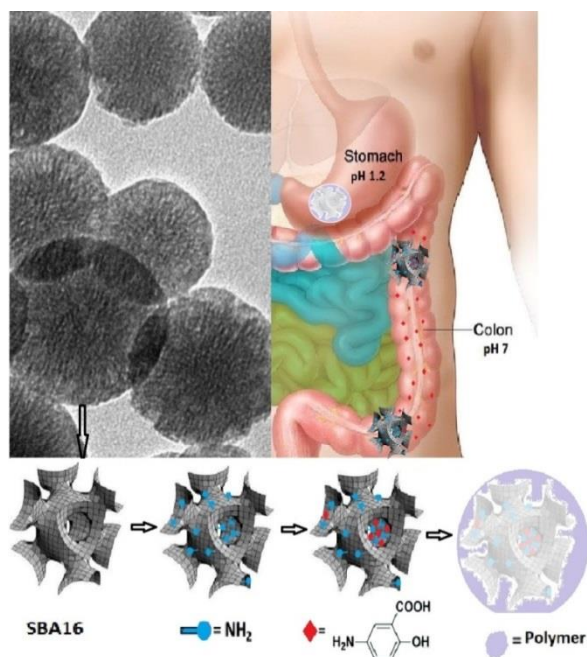
1. Получаване на модифицирани мезопорести силикатни наночастици (MCM-41, SBA-15 и SBA-16) с цел използването им като носители на противовъзпалителни лекарствени вещества (месалазин и сулфасалазин) за перорално приложение.
2. Разработване на дермални системи за биофлавоноида кверцетин на основата на Zn-модифицирани мезопорести силикатни (MCM-41 и SBA-16) наночастици.
3. Разработване на двукомпонентна лекарствена система на основата на магнитни желязооксидни/силикатни нанокomпозитни като носители за едновременно доставяне на противотуморни и противовъзпалителни лекарствени вещества (митоксантрон и преднизолон).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Получаване на модифицирани мезопорести силикатни наночастици за контролирано доставяне на противовъзпалителни лекарствени вещества (месалазин и сулфасалазин) в гастроинтестиналния тракт

През последните години, разработването на системи за доставяне на лекарствени вещества (ЛВ) до определени участъци на дебелото черво (колон) представлява голям интерес, тъй като касае често срещани заболявания, като улцерозен колит, болест на Крон, някои инфекции и констипация, изискващи локално лечение. Конвенционалните подходи за приготвянето на орални лекарствени форми за селективно доставяне в гастроинтестиналния тракт са свързани с разработване на доставящи системи с рН-, време- или ензим-зависимо освобождаване на ЛВ. Системите с рН-зависимо доставяне използват факта, че рН на човешкия стомашно-чревен тракт се увеличава постепенно от стомаха (рН = 1-2.5), през тънко черво (рН = 6.0-6.8) до дебелото черво (рН = 6.8-8.0). За да се постигне оптимално време на действие на ЛВ е необходимо да се удължи неговия престой в целевия участък на стомашно-чревния тракт, което може да бъде постигнато чрез натоварването му в наноразмерни носители. Нанасянето на ЛВ за потенциално приложение в гастроинтестиналния тракт в мезопорести силикати и обвиването им с подходящ полимерен полиелектролитен комплекс може да намали преждевременното му освобождаване преди достигане на целевия участък и там да осигури забавеното му освобождаване. Сулфасалазинът е предлекарство, използвано за лечение на възпалителни процеси в червата, като той се метаболизира в колона от специфични ензими до двата му активни метаболита - сулфапиридин и месалазин. Месалазин (Mes) се използва за поддържане на ремисията на улцерозен колит при пациенти с непоносимост към сулфасалазин (Ss) и за лечение на болестта на Крон. Основният проблем при прилагането на тези вещества за лечение на възпаления в червата е ниската им стабилност при физиологичните условия в стомаха. Основна задача в разработването на подходяща система за доставка на тези две лекарствени вещества е доставянето им в червата в достатъчна концентрация и избягване на преждевременното им освобождаване в стомаха.

1.1. Получаване на модифицирани мезопорести силикатни наночастици за контролирано доставяне на противовъзпалителното лекарство месалазин



Сферичен SBA-16 мезопорест силикат е получен по зол-гел метод, при който структуроопределящи агенти са Pluronic F127 (триблоков съполимер на основата на полиетилен гликол и полипропилен гликол) и СТАВ (хексадецил триметиламониев бромид), а като източник на силиций е използван TEOS (тетраетил ортосиликат). За

функционализирането на мезопорестия силикат е разработена следсинтезна процедура за въвеждане на amino групи, при която като модифициращ агент е използван 3-(аминопропил)триетоксисилан (APTES), получените проби са означени като SBA-16NH₂. Прахообразните проби SBA-16NH₂ са натоварени с месалазин чрез мокро смилане в кисела среда. Приготвени са образци с различно съотношение лекарствено вещество:силикатен носител и са означени, като SBA-16NH₂Mes_x, където $x = 1, 0.75, 0.5, 0.25$ отговаря на съотношението месалазин:носител. Последващото обвиване с полимери на натоварените с месалази образци се извършва по метода на импрегниране с омокряне. Обвитите с полимер проби са означени, като SBA-16NH₂Mes_xS или SBA-16NH₂Mes_xSRL съответно за обвитите само с Eudragit S или Eudragit S+Eudragit RL образци.

Рентгеноструктурният анализ при малки ъгли на изходния SBA-16 материал показва рефлексии, потвърждаващи формирането на подредена кубична мезоструктура. За модифицираните и съдържащи месалазин (5-амино салицилова киселина, Схема 1) мезопорести образци в зависимост от количеството на натоварено лекарствено вещество се наблюдава намаляване интензитета и появата на уширения на рефлексите, което е индикация за намаляване на структурната подреденост (Фигура 1А).

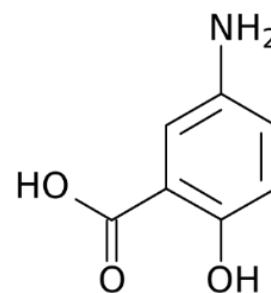
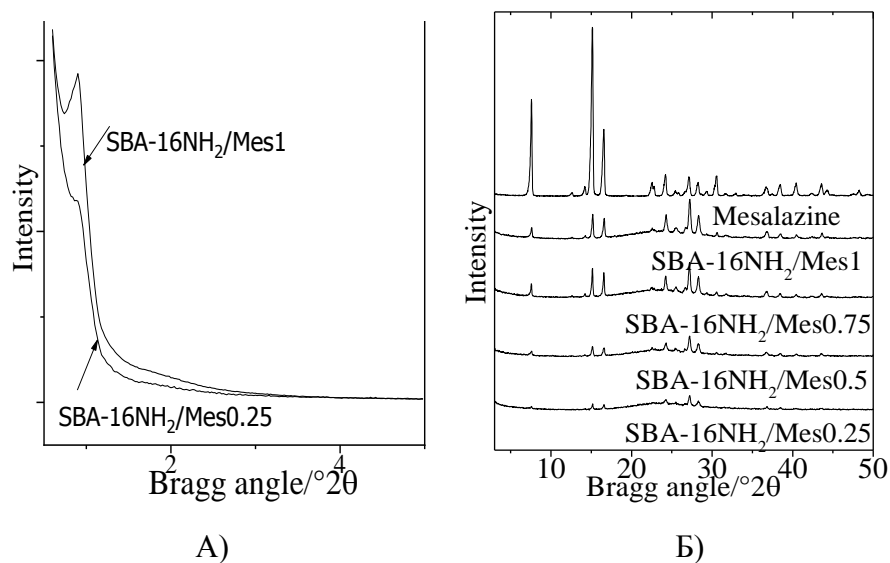


Схема 1. Структура на молекулата на месалазин

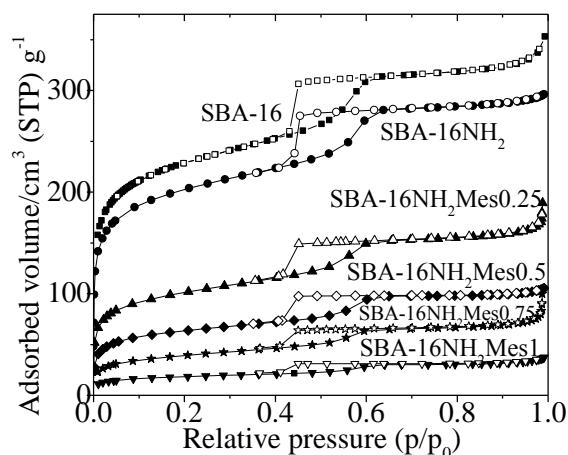


Фигура 1. Прахови рентгенови дифрактограми на SBA-16NH₂Mes0.25 и SBA-16NH₂Mes1 (А) и месалазин и ЛДС натоварени с различно количество лекарствено вещество (Б)

На Фигура 1Б са представени рентгеновите дифрактограми при големи ъгли, където се наблюдава наличие на кристален месалазин в SBA-16NH₂ пробите. Това е доказателство, че част от лекарственото вещество се намира на външната повърхност на силикатните частици. Количеството на месалазин на външната повърхност зависи от отношението лекарство:носител. Най-голямо количество на месалазин в кристална форма се наблюдава при пробите SBA-16NH₂Mes0.75 и SBA-16NH₂Mes1, но дори и при образците с най-ниско съдържание на месалазин малка част от него се намира на външната повърхност на частиците.

Азотните адсорбционни и десорбционни изотерми на изходните, модифицираните и натоварените с месалазин образци са представени на Фигура 2. Текстурните параметри на всички образци са обобщени в Таблица 1. Изотермите на изходните и модифицирани с amino групи SBA-16 носители са тип IV (IUPAC classification) с ясно изразени капилярна

кондензация и хистерезис, които са характерни за 3D материали с еднотипни пори с бимодална структура. Модифицирането на SBA-16 с amino групи води до намаляване на специфичната повърхност, размера на порите и поровия обем, което е доказателство, че функционалните органични групи са разположени и върху вътрешната повърхност в мезопорите. От Фигура 2 може да се види, че наличието на месалазин в SBA-16NH₂ води до значителна промяна във формата на хистерезиса. Хистерезисът на всички натоварени с месалазин проби се затваря при по ниски стойности на относителното налягане, в сравнение с изходния носител, което е индикация за запълването на порите с лекарственото вещество. Нарастването на съотношението месалазин:носител също води до намаляване на специфичната повърхност и поровия обем, потвърждавайки натоварването на месалазина в порите на носителя (Фигура 2, Таблица 1).



Фигура 2. Азотни адсорбционни и десорбционни изтерми на изходен и NH₂-функционализиран SBA-16 силикат и натоварените с месалазин проби

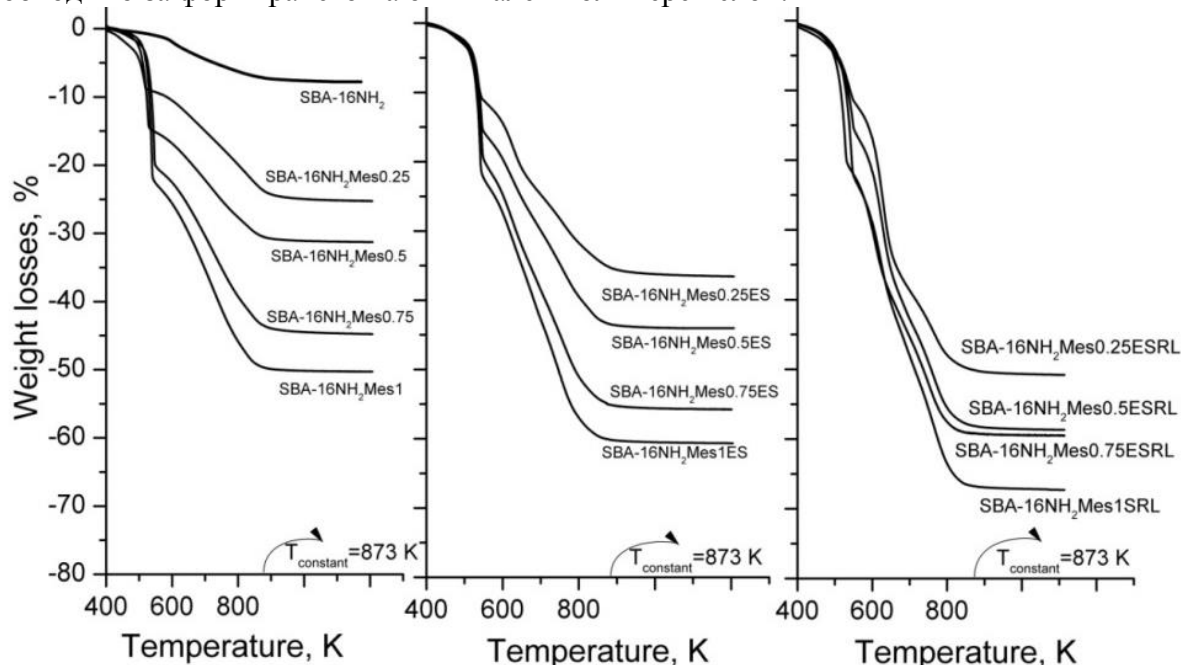
Таблица 1. Текстурални свойства на изследваните проби

Проби	BET (m ² /g)	Обем на порите (cm ³ /g)	Поров диаметър ^a (nm)
SBA-16	849	0.56	5.2
SBA-16NH ₂	755	0.45	5.0
SBA-16NH ₂ Mes0.25	374	0.25	5.0
SBA-16NH ₂ Mes0.5	236	0.16	5.0
SBA-16NH ₂ Mes0.75	144	0.11	4.9
SBA-16NH ₂ Mes1	68	0.05	5.1

^a – среден диаметър на порите определен чрез ВЛН модел;

С цел да се забави и контролира процеса на освобождаване на месалазин, натоварените SBA-16NH₂ проби са обвити двуслойно с комбинация от полимери тип Eudragit: Eudragit S 100 и Eudragit RL 100. Eudragit S 100 е анионен съполимер на базата на метакриловата киселина и метил метакрилат и се характеризира с рН-зависимо разтваряне, неразтворим е в кисело рН, каквото е рН в стомаха и горните отдели на тънките черва, но се разтваря в среда с около рН 7, каквото е в колона. Eudragit RL 100 е съполимер на етил акрилат, метил метакрилат и с ниско съдържание на естер на метакрилова киселина с квартернерни амониеви групи, неразтворим, но набъбващ във вода, като степента му на набъбване е рН-независимо. Следователно комбинацията от двата полимера позволява разработване на системи с контролирано по време и място освобождаване на месалазин. Слой от Eudragit S, възпрепятства освобождаването на месалазин в стомаха и горните отдели на тънките черва, докато след достигане до колона където рН е 6.8 – 7 полимера се разтваря. Наличието обаче на втори полимерен слой от Eudragit RL 100 осигурява контролираното по време освобождаване на месалазин, тъй като набъбналият полимер образува дифузионна преграда за молекулите на ЛВ, която контролира скоростта на освобождаване. Съдържанието на месалазин и полимер в изследваните образци е определено чрез

термогравиметричен анализ и е представено в Таблица 2. Количеството на пропиламино групите на повърхността на SBA-16 носителя е 8.5%. Чрез TGA се определя действителното количество лекарствено вещество натоварено в мезопорестия носител, след корекция за съдържанието на вода и аминопропилни групи за SBA-16NH₂Mes пробите (Фигура 3). Загубата на тегло от полимерния слой от Eudragit S при всички образци е ~10–12% (Фигура 3, Таблица 2), което е изчислено чрез корекция на загубата на тегло за аминопропиловите групи и месалазина. Резултатите свидетелстват, че чрез приложената процедура се нанася почти еднакво количество от използвания полимер, необходимо за формирането на оптимален полимерен слой.



Фигура 3. Термогравиметричен анализ на функционализирани, натоварени с месалазин и обвити с полимери SBA-16 силикатни носители

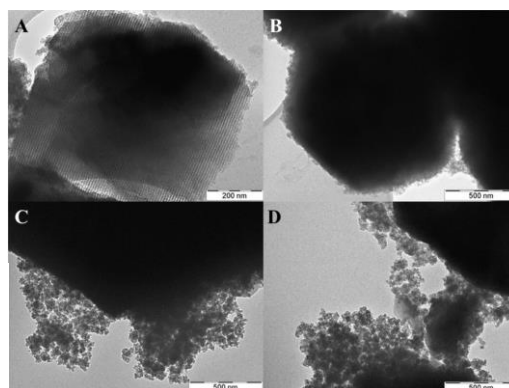
Таблица 2. Химичен състав на обвити с полимер и натоварени с месалазин SBA-16NH₂ образци

Проба	Месалазин ^a , %	Разпадане на месалазин до 540 K ^a , %	Разпадане на месалазин над 540 K ^a , %	Eudragit S ^a , тегл.%	Eudragit S+RL ^a , тегл.%
SBA-16NH ₂ Mes0.25	17.9	8.8	9.1	10.5	24.3
SBA-16NH ₂ Mes0.5	23.1	14.5	8.6	12.5	27.1
SBA-16NH ₂ Mes0.75	36.6	20.0	16.6	11.0	14.6
SBA-16NH ₂ Mes1	42.1	21.8	20.3	10.4	17.1

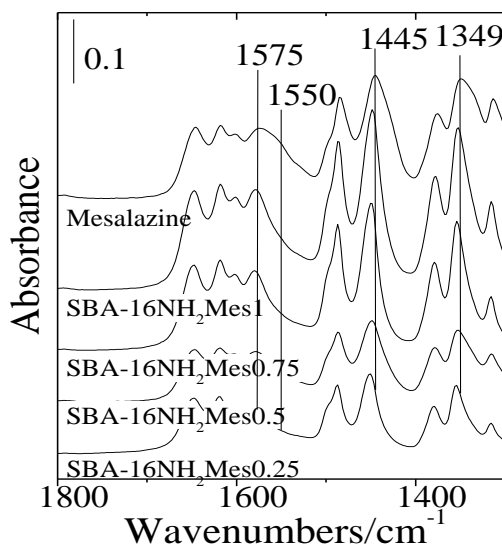
^aданни от термогравиметричния анализ на пробите проведен в поток от въздух при 600°C със скорост на нагряване 5 °C/min.

ТЕМ изображенията на изходния SBA-16 и обвития с два полимерни слоя SBA-16NH₂Mes0.5 материал са представени на Фигура 4. Получените резултати показват, че процедурата на натоварване и обвиване на мезопорестия материал не водят до промени в морфологията на SBA-16 наночастици.

Фигура 4. ТЕМ изображения на изходен SBA-16 (A, B) обвития с два полимерни слоя SBA-16NH₂Mes0.5 (C, D) материал



ATR-FTIR методът е използван за изследване взаимодействието на молекулата на месалазина с amino-функционализирания SBA-16 силикатен носител (Фигура 5). Наличието на amino групи е потвърдено от появата на ивица при 1540 cm^{-1} за функционализирания SBA-16. Кристалният месалазин е под формата на 5-аминосалицилатен цвтерийон (Схема 2А). Доказателство за това са ивиците характерни за COO^- при 1575 , 1445 и 1349 cm^{-1} и наличието на рамо за NH_3^+ деформационни трептения при 1550 cm^{-1} в спектрите на месалазина. В спектрите на SBA-16NH₂Mes1 ивиците за COO^- са изместени към по-големи дължини на вълната (от 1575 на 1579 cm^{-1} , от 1445 на 1448 cm^{-1} и от 1349 на 1353 cm^{-1}) и интензитетът на ивицата за NH_3^+ е по-нисък. Тези спектрални изменения предполагат, че междумолекулните водородни връзки в месалазина намаляват. Освен това, отместването на ивиците за COO^- на месалазина зависят и от количеството, в което е нанесен: по-ниско съдържание на месалазин води до по-голямо отместване на ивиците към по-високи стойности на дължината на вълната. Въпреки това, спектрът на SBA-16NH₂Mes0.75 пробата прилича на този на чистото вещество месалазин по наличието на ивици при 1550 и 1344 cm^{-1} от което следва, че известно количество месалазин може да остане в цвтерийонна форма с междумолекулни водородни връзки. Най-вероятно използването на кисел буфер при процедурата на нанасяне на ЛВ води до неговата по-добра разтворимост чрез намаляване на водородните връзки между мрежата от цвтерийони на лекарственото вещество. Липсата на ивици за депротонирани карбоксилни групи ($\nu(\text{C}=\text{O})$ при $1730\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$) в спектрите на SBA-16NH₂Mes вероятно се дължи на слабото взаимодействие на COO^- групите на месалазина и amino групите на функционализирания SBA-16. Този ефект може да бъде обяснен с формирането на хлорид на 5-аминосалициловата киселина (Схема 2Б) по време на процедурата на натоварване, което възпрепятства образуването на връзки между молекулите на лекарственото вещество.



Фигура 5. ATR-FTIR спектри на месалазин и натоварен месалазин в amino-модифициран SBA-16 силикат

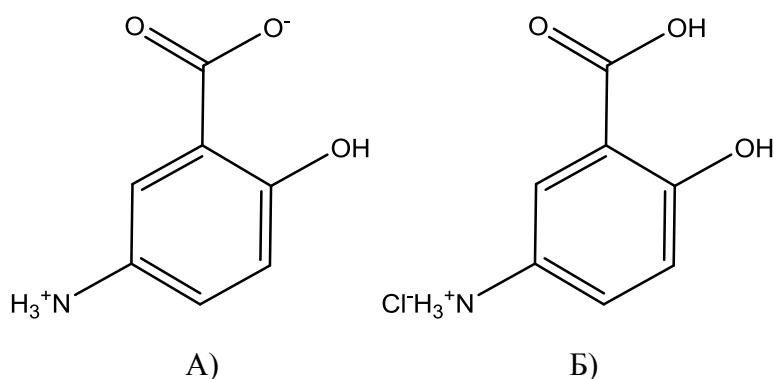
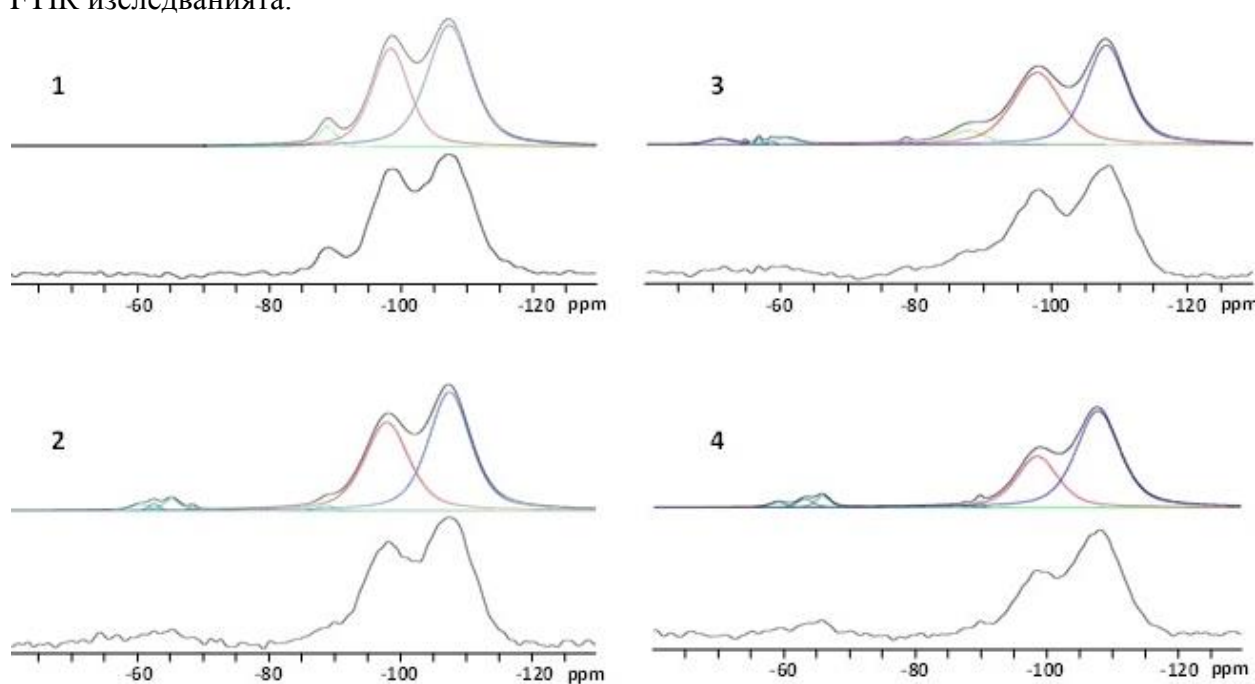


Схема 2. Структура на 5-аминосалицилат (А) и 5-аминосалицилов хлорид (Б)

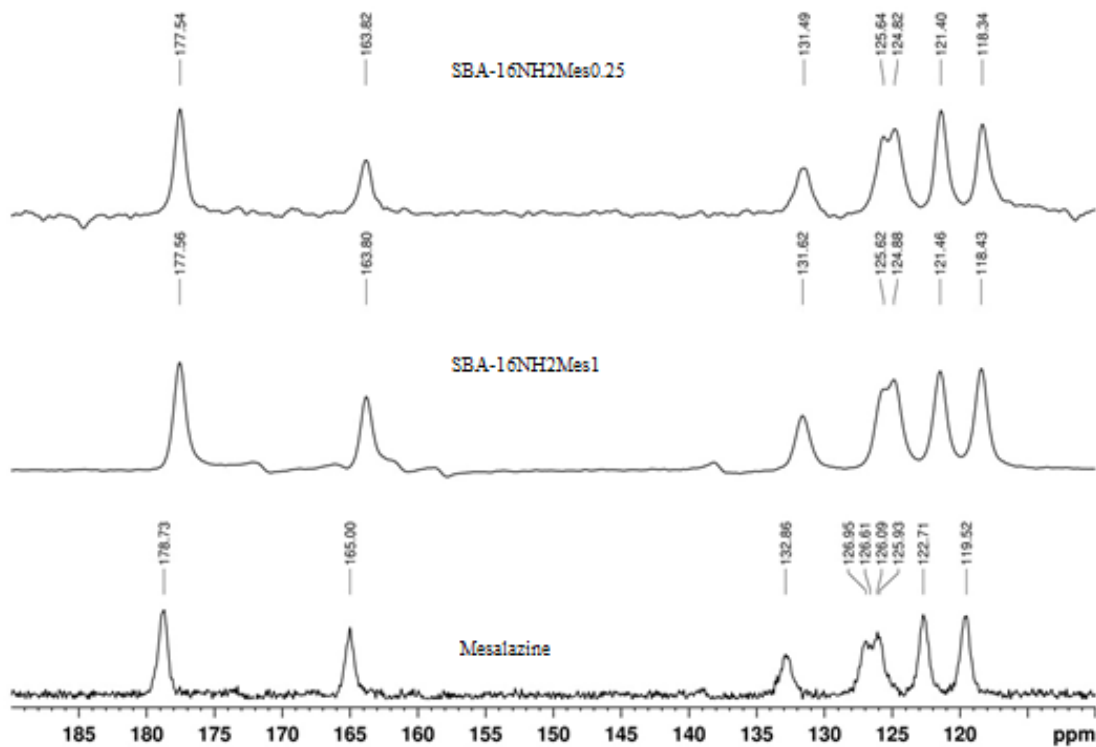
Изходните SBA-16, SBA-16NH₂, SBA-16NH₂Mes0.25 и SBA-16NH₂Mes1 образци са изследвани с ²⁹Si NMR (Фигура 6). В спектъра на сферичния наноразмерен SBA-16 материал са регистрирани три пика при -106, -96 и -89 ppm, които могат да бъдат свързани с Q4, Q3 и Q2 специи от силикатната решетка [Q_n=Si(OSi)_n(OH)_{4-n}, n=2-4]. При модифицирането с аминогрупи се наблюдава изчезване на ивицата за Q2 и намаляването на интензитета на ивиците за Q3 и Q4. ²⁹Si спектрите са разложени с цел да се анализира количественото отношение на различните специи Q2, Q3, Q4 след процедурите на функционализиране и натоварване с ЛВ (Фигура 6, Таблица 3). Съотношението Q2+Q3/Q4 е 40% за изходния SBA-16 и 44% за функционализирания SBA-16NH₂ силикат. Натоварването с месалазин води до допълнително увеличение на това съотношение до 46% за пробата съдържаща най-малко количество ЛВ (SBA-16NH₂Mes0.25). При пробата с най-голямо количество нанесено ЛВ (SBA-16NH₂Mes1) се наблюдава обратната зависимост, т.е. значително намаляване на съотношението Q2+Q3/Q4 до 33%. По-голямата част Q4, която е индикация за нарастващо омрежване и може да бъде обяснена ако допуснем, че по-голямото количество месалазин благоприятства взаимодействието лекарство-лекарство вместо лекарство-силикатен носител. Тези резултати са в съответствие с данните от ¹³C NMR. Фигура 7 показва ¹³C спектрите на SBA-16NH₂Mes0.25, SBA-16NH₂Mes1 и чистия месалазин, където по-големи промени в химичните отмествания се наблюдават за пробата с ниско съдържание на ЛВ в сравнение с чистия месалазин. Тези промени в химичните отмествания в ¹³C спектъра при наличие на месалазин също са индикация за наличието на взаимодействие между молекулите на ЛВ и силикатната матрица, което е по-силно в случаите на по-ниското му съдържание в пробите. Данните от направения NMR анализ са в съответствие с резултатите от ATR-FTIR изследванията.



Фигура 6. ²⁹Si NMR спектри на изходен (1), SBA-16NH₂ (2) и SBA-16NH₂Mes0.25 (3) и SBA-16NH₂Mes1 (4)

Таблица 3. ²⁹Si NMR данни за изследваните проби

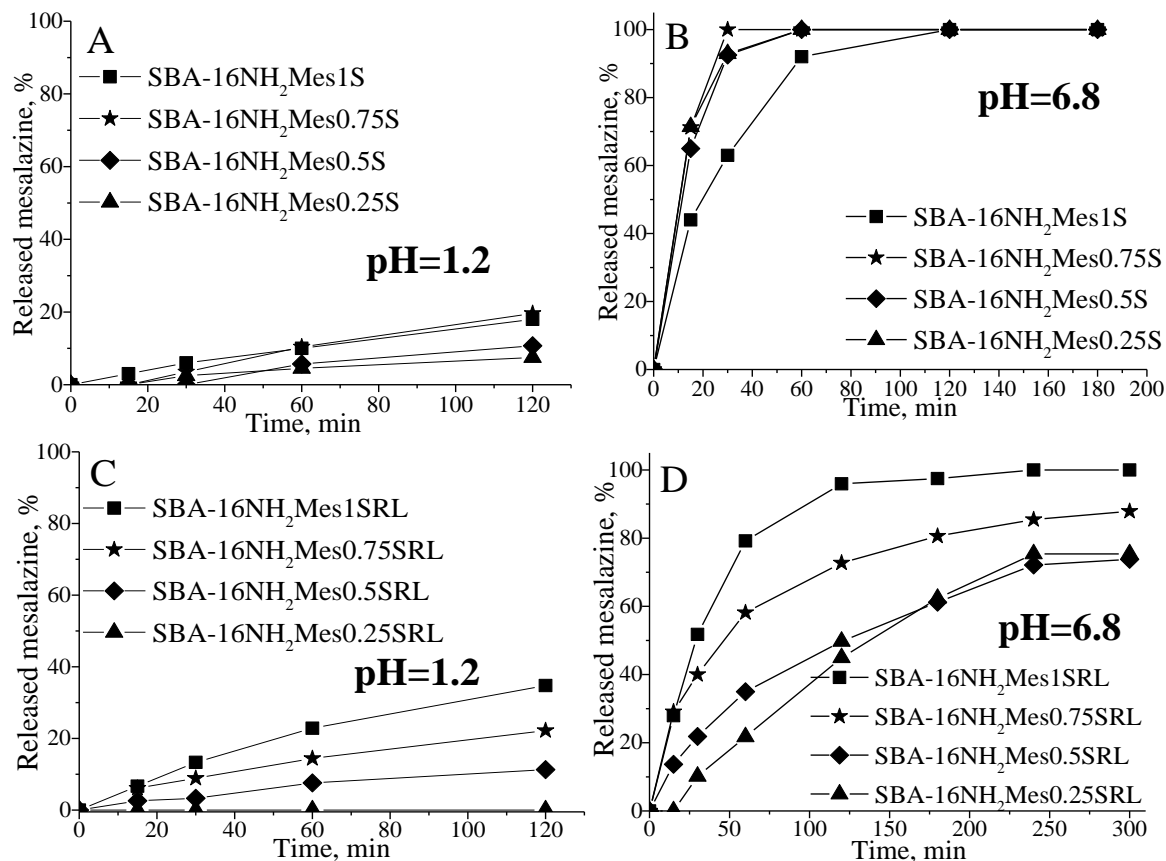
Проба	SBA-16	SBA-16NH ₂	SBA-16NH ₂ Mes0.25	SBA-16NH ₂ Mes1
Q2+Q3/Q4, %	40	44	46	33



Фигура 7. ^{13}C NMR спектри на SBA-16NH₂MES0.25, SBA-16NH₂MES1 и чистия месалазин

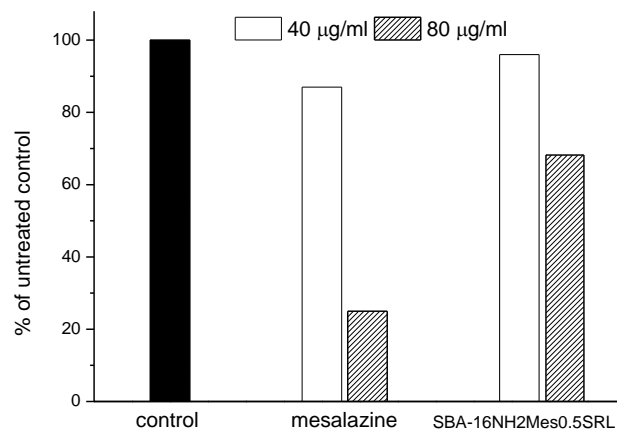
Процедурата на обвиване с pH – зависимия съполимер Eudragit S води до значително понижаване на освобождаването на лекарственото вещество в кисел буфер, което предполага забавено освобождаване на месалазин при физиологичните условия на стомашните течности. Това поведение се наблюдава при всички проби. В зависимост от натовареното количество се освобождава едва 20% месалазин до 2 часа в буфера с pH=1.2 (Фигура 8A). От друга страна при буфера с pH=6.8 се регистрира бързо освобождаване на ЛВ (Фигура 8B).

Пълното, но забавено (до 2 часа) освобождаване на месалазин е постигнато за SBA-16NH₂Mes1 обвит с Eudragit S в буфер с pH=6.8, докато за другите проби се наблюдава пълно освобождаване в рамките на 1 час (Фигура 8B). Това е важен факт, имайки предвид, че за лечение на заболявания свързани с възпалителни процеси на тънките черва месалазина трябва да се освободи в чревните течности, които са с по-високо pH. В тази връзка с цел постигане на контролирано освобождаване в целевия участък, пробите са обвити с втори полимерен слой от Eudragit RL. Както може да се очаква, обвиването с Eudragit RL води до значително забавяне на освобождаването на месалазин и в буфера с по-високо pH (6.8) (Фигура 8D) в сравнение с тези с един Eudragit S полимерен слой. Следователно обвиването с Eudragit RL предотвратява първоначалното бързо освобождаване, което се наблюдава често за системи на базата на мезопорести силикати. При pH=1.2 освобождаването на месалазин от образците с два полимерни слоя е забавено или индентично с това при образците с един полимерен слой до съотношение лекарство:носител=0.75:1 (Фигура 8C). В случая на образца натоварен с най-голямо количество месалазин се наблюдава слабо повишаване на освободеното количество в сравнение с образца обвит само Eudragit S. Този ефект може да се дължи на голямото количество „свободен“ месалазин на външната повърхност на силикатния носител и на нарушаване на слоя от Eudragit S при процедурата на нанасяне на втория полимерен слой. Най-ефективно контролирано и целево освобождаване е постигнато за обвит с два полимерни слоя модифициран SBA-16 носител с нанесено количество месалазин до 23%.



Фигура 8. Профили на освобождаване на месалазин от ЛДС на базата на SBA-16NH₂ материали обвити с полимери при pH=1.2 и pH=6.8

Цитотоксичността на получените лекарство-доставящи системи (ЛДС) е оценена чрез третиране с концентрации от 40 и 80 µg/ml на клетъчни линии от епителни клетки на дебело черво (HT-29, Фигура 9). Чистото лекарствено вещество показва цитотоксична активност при HT-29 клетките, което е по-силно изразено при високите концентрации (80 µg/ml). Докато месалазин натоварен в мезопорест силикат (SBA-16NH₂Mes0.5 SRL) показва значително по-ниска цитотоксичност при високата концентрация и никаква при ниската. Тези резултати предполагат, че натоварването на месалазин в използваните носители и последващото им обвиване с избраните полимери позволява запазването на основния му терапевтичен ефект, но намалява цитотоксичността му върху епителните клетки.



Фигура 9. *In vitro* оценка на цитотоксичността на чист месалазин и SBA-16NH₂Mes0.5SRL върху HT-29 клетъчна линия

1.2. Получаване на модифицирани мезопорести силикатни наночастици за контролирано доставяне на предлекарството сулфасалазин

Синтезирани са сферичен MCM-41 и сферичен SBA-15, където като структуроопределящи агенти са използвани, съответно, СТАВ и Pluronic P123, а като източник на силиций – TEOS. Получените мезопорести силикатни носители са модифицирани следсинтезно с amino групи (APTES) и са означени като MCM-41NH₂ и SBA-15NH₂. Чрез метод на импрегниране чрез омокряне са приготвени образци с тегловно съотношение сулфасалазин:носител = 0,5, които са означени MCM-41NH₂/Ss и SBA-15NH₂/Ss. За играждане на полимерния полиелектролите слой около частиците са използвани същите полимери, като при системите с месалазин. Обвитите образци са означени, като SBA-15NH₂/Ss(SRL) и MCM-41NH₂/Ss(SRL).

Резултатите от изследванията с прахова рентгенова дифракция на сферичните MCM-41 и SBA-15 материали при малки ъгли потвърждават формирането на хексагонална структура. Намаление на интензитета и появата на уширени рефлексии се наблюдават за функционализираните и натоварените със сулфасалазин (Схема 3) проби, което е признак за известно намаление на структурна подреденост. От рентгеновите дифрактограми снети при големи ъгли се регистрира наличието на кристална фаза на сулфасалазин и за двете проби - MCM-41NH₂ и SBA-15NH₂ (Фигура 10). Това е доказателство, че част от натовареното в мезопорестите носители ЛВ може да бъде намерено на външната повърхност на малките сферични частици или в междучастичковото пространство.

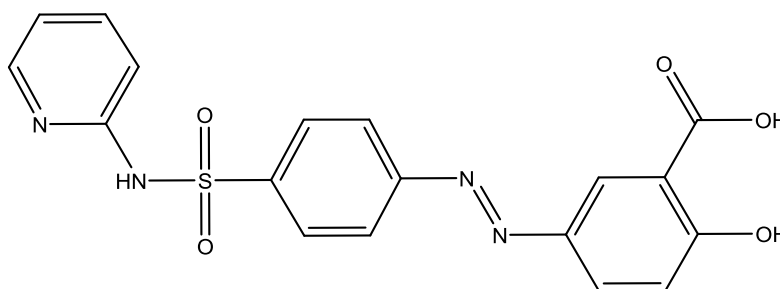
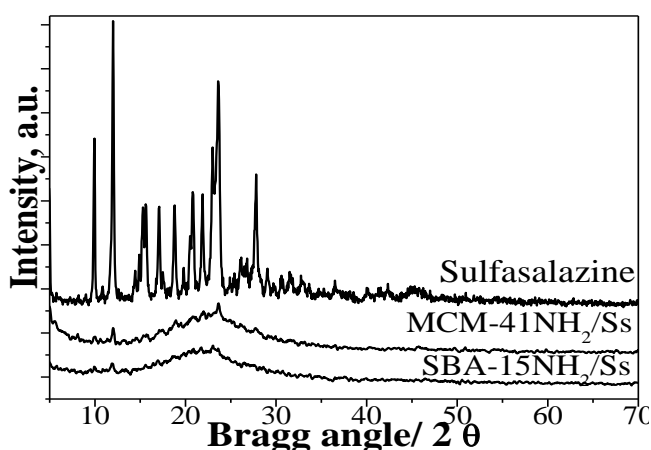


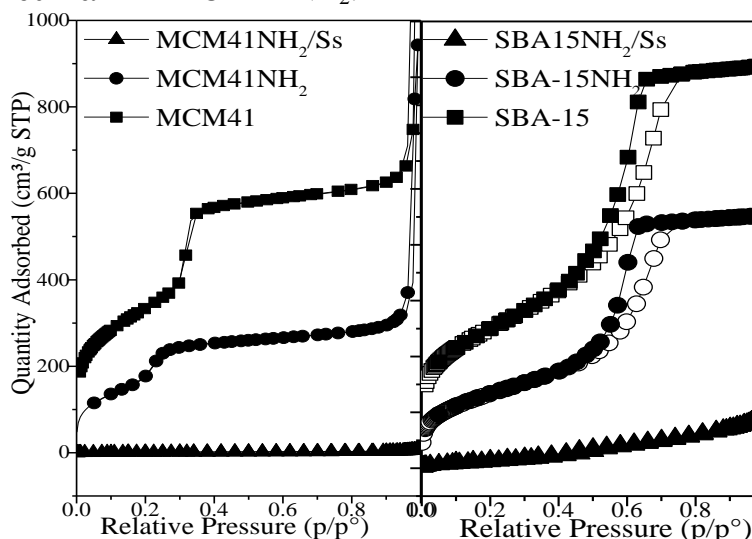
Схема 3. Структура на молекулата на сулфасалазин



Фигура 10. Прахови рентгенови дифрактограми на amino-модифицираните и натоварени със сулфасалазин MCM-41 и SBA-15 носители

Изотермите от азотната физисорбция на изходните, amino-модифицираните и натоварените със сулфасалазин проби са представени на Фигура 11. Текстуричните параметри са обобщени в Таблица 4. Изотермите на изходния и amino-модифициран MCM-41 показват рязко нарастване на адсорбцията при относително налягане в интервала $p/p_0=0.2-0.4$, което се свързва с капилярна кондензация на азота в каналите, а също така и с тясно разпределение по размер на порите. Изотермите на SBA-15 пробите са тип IV с хистерезис. Значително намаление на специфичната повърхност и поровия обем се наблюдават за натоварените със сулфасалазин проби. Този ефект е индикация за

запълване на порите с лекарствени молекули и е по-силно изразен за системите на базата на мезопорестия носител тип MCM-41NH₂.

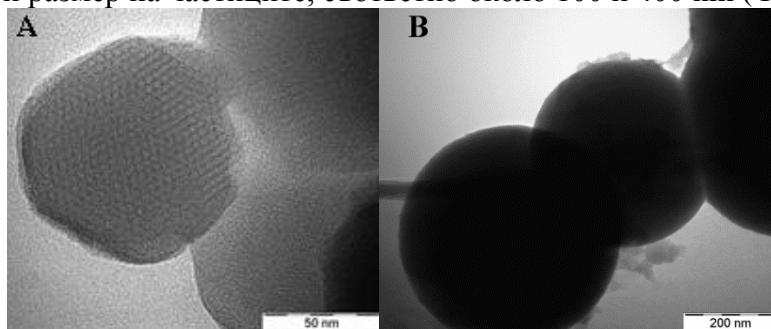


Фигура 11. Азотни адсорбционни и десорбционни изтерми на изходните, аминок-модифицираните и натоварените със сулфасалазин проби

Таблица 4. Текстурални свойства на изходните, аминок-модифицираните и натоварените със сулфасалазин проби

Проба	ВЕТ, (m ² /g)	Обем на порите, (cm ³ /g)	Поров диаметър ^a , (nm)
MCM-41	1100	0.9	2.3
MCM-41NH ₂	878	0.8	2.1
MCM-41NH ₂ /Ss	135	0.2	1.8
SBA-15	850	1.0	5.9
SBA-15NH ₂	805	0.9	5.8
SBA-15NH ₂ /Ss	160	0.2	5.5

ТЕМ изображенията показват, че получените MCM-41 и SBA-15 материали са със сферична форма и размер на частиците, съответно около 100 и 400 nm (Фигура 12).



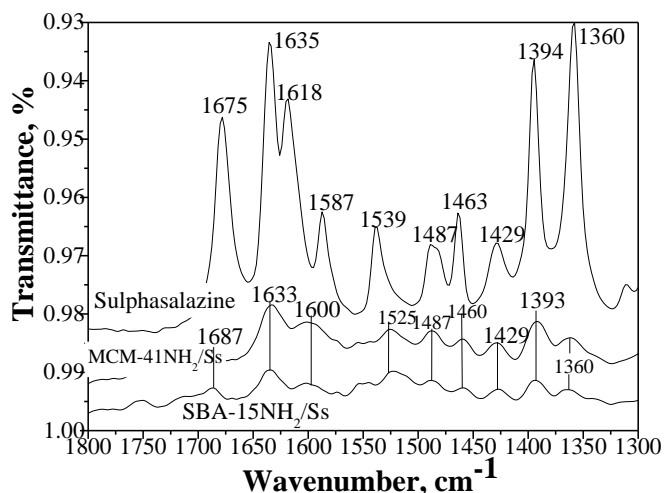
Фигура 12. ТЕМ изображения на MCM-41(A) и SBA-15(B) образци

ATR-FTIR метод е използван за изучаване на взаимодействието на молекулата на сулфасалазина и групите от повърхността на модифицираните носители. В областта 1300–1800 cm⁻¹ от FTIR спектъра на сулфасалазина са регистрирани няколко ивици, които се свързват с присъствие на следните групи:

Таблица 5. Регистрирани ивици в FTIR спектъра на сулфасалазина

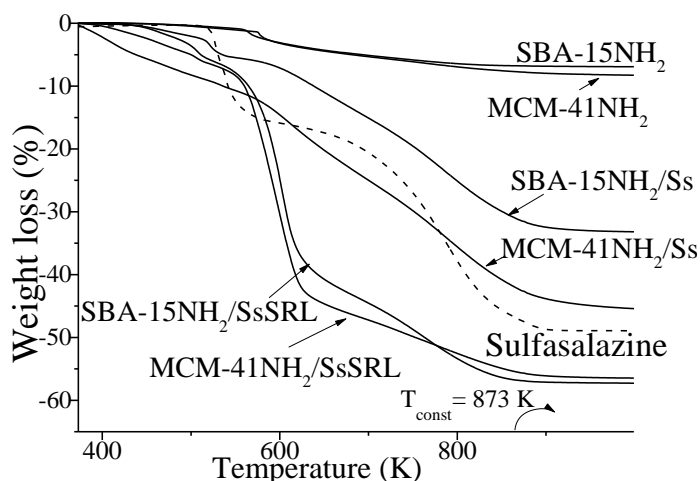
Позиция, cm ⁻¹	Интерпретация
1360	асиметрични валентни трептения на SO ₂
1394	валентни трептения на OH
1429	Симетрични валентни трептения на COO
1463	СС пръстенни валентни трептения
1487	СС пръстенни валентни трептения
1539	асиметрични валентни трептения на СС пръстен
1587	валентни трептения на N=N
1618	асиметрични валентни трептения на COO
1675	валентни трептения на C=O

ATR-FTIR спектрите (Фигура 13) на натоварения сулфасалазин показват ивици при 1555 cm^{-1} , които могат да бъдат приписани на деформационни трептения на протонирани amino групи (NH_3^+). В спектрите на MCM-41NH₂/Ss и SBA-15NH₂/Ss образците се наблюдава отместване на ивиците при 1539 cm^{-1} и 1618 cm^{-1} от спектъра на чистото ЛВ съответно на 1525 cm^{-1} и 1600 cm^{-1} . Първата от тези ивици е свързана с асиметрични C-C валентни трептения в ароматното ядро, а втората с асиметрични валентни трептения на COO група. Отместванията се дължат на взаимодействие на тези функционални групи от молекулата на сулфасалазина с amino групите от повърхността на модифицираните носители.



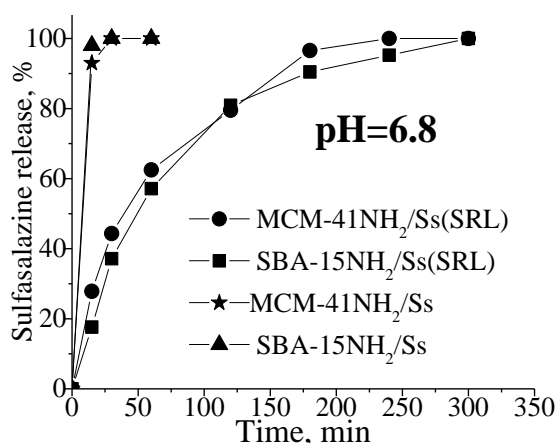
Фигура 13. ATR-FTIR спектри на чист и натоварен в модифицирани MCM-41 и SBA-15 силикати сулфасалазин

Функционалните групи, сулфасалазина и полимерите са количествено определени чрез термогравиметричен метод. Количеството пропиламино групи на повърхността на MCM-41NH₂ и SBA-15NH₂ е съответно 8.3 тегл.% и 6.7 тегл.% (Фигура 14). Чрез TGA е определено действителното количество на ЛВ в носителите след коригиране на кривите за съдържанието на вода и пропиламино групи. Изчисленото съдържание на сулфасалазин за MCM-41NH₂/Ss е 37.2 тегл.%, а за SBA-15NH₂/Ss - 26.3 тегл.%. Загубата на тегло от слоевете от Eudragit S и Eudragit RL в MCM-41NH₂/Ss е 7 тегл.% и 5 тегл.% за SBA-15NH₂/Ss (Фигура 14). Количеството на полимерите е изчислено чрез корекция за загубата на тегло от аминопропиловите групи и сулфасалазина. За да се осигури точното определяне на количеството сулфасалазин, полимерните разтвори са проверени за евентуални загуби на ЛВ по време процедурата на обвиване. Резултатите показваха, че количеството сулфасалазин след обвиването с полимери се запазва същото, като в необвитите проби, което е доказателство, че при приложената процедура на изграждане на полимерните слоеве не се извлича ЛВ от мезопорестите носители.



Фигура 14. Термогравиметричен анализ на изследваните проби

Резултатите от проведените *in vitro* тестове за освобождаване показаха, че за необвитите с полимер проби не е регистрирано освобождаване на сулфасалазин при pH=1.2, докато при pH=6.8 се наблюдава изключително бързо разтваряне на ЛВ (до двадесета минута, Фигура 15).



Фигура 15. *In vitro* освобождаване на сулфасалазин от модифицирани и обвити с полимери силикатни носители материали

И при двата типа функционализирани и обвити мезопорести силикатни наночастици (MCM-41 и SBA-15) профила на освобождаване показва, че скоростта е значително по-ниска в сравнение с необвитите. Изграждането на полимерен полиелектрилитен слой намалява първоначалното бързо освобождаване. В заключение може да се каже, че обвиването с два слоя полимери (Eudragit S и Eudragit RL) дава възможност за контролирано доставяне на ЛВ в желан регион от гастроинтестиналния тракт в зависимост от pH на средата.

2. Разработване на дермални доставящи системи за кверцетин на основата на Zn-модифицирани мезопорести силикатни наночастици

Биофлавоноидите са природни полифенолни съединения, които са потенциални кандидати за лекарства поради редица доказани фармакологични ефекти като: антиоксидантен, противовъзпалителен, противотуморен и други. Кверцетинът (2-(3', 4'-дихидроксифенил)-3,5,7-трихидрокси-4Н-хромон-4-он, Схема 4) е престабител на тази група съединения и се характеризира с широка гама от свойства като противотуморни, противовъзпалителни, антимуtagenни, антивирусни, предпазване от диабет и различни алергии и възможност за предотвратяване на увреждания на кожата, причинени от вредните ултравиолетови лъчения. Използването му за превенция и лечение на редица заболявания обаче е ограничено поради слабата му водоразтворимост и ниската му стабилност в неутрална и алкална среда. Един от подходите за решаването на тези проблеми и повишаване на бионаличността му е включването му в различни наноразмерни доставящи системи. В литературата има сведения, че носители на основата на липозоми могат да подобрят трансдермалното доставяне на хидрофобни антиоксиданти като кверцетин, което е предпоставка за успешното лечение на различни видове възпалителни процеси и ракови заболявания на кожата.

Натоварването на кверцетин в порите на мезопорести силикатни носители предоставя възможност за подобряване на неговата разтворимост. За нашите изследвания сме използвали мезопорести силикати с различна структура - MCM-41 с 2D хексагонална структура и SBA-16 с 3D кубичната структура. Модифицирането с Zn на носителя може да благоприятства формиране на комплекси между модифициращите йони и молекулите на кверцетина, което би подобрило степента на натоварване на биофлаваноида и е предпоставка за оптимизиране на фармакологичните му свойства.

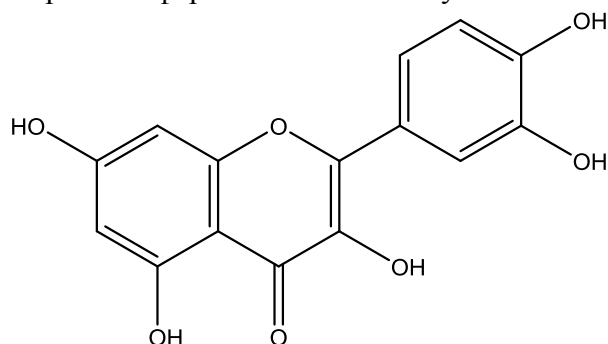
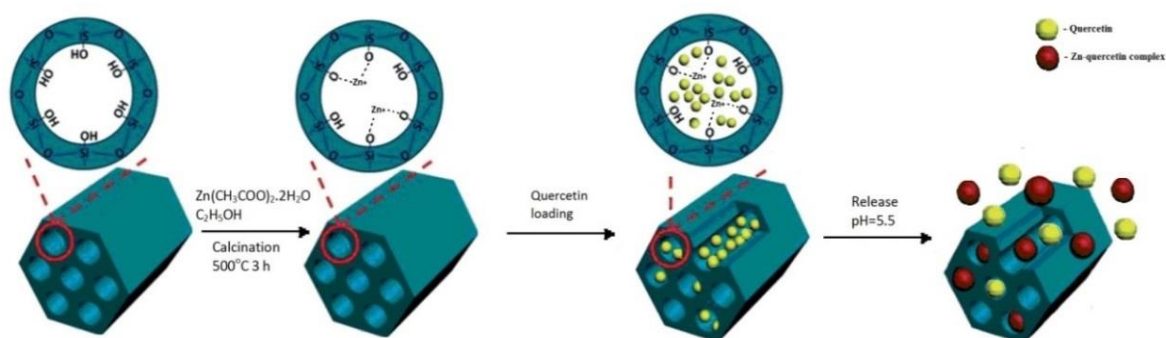


Схема 4. Структура на молекулата на кверцетина



За получаване на доставящи системи на кверцетин синтезираните MCM-41 и SBA-16 мезопорестите силикатни материали са следсинтезно модифицирани с различни количества Zn (2, 4%) чрез импрегниране, с оглед изследване влиянието на количеството метални йони върху свойствата им като потенциални носители на лекарствени вещества. Получените образци са означени, като SBA-16xZn и MCM-41xZn, където x=2/4. След което всички получени образци са натоварени с кверцетин, чрез импрегниране с омокряне и означени, като SBA-16Qu, MCM-41Qu, SBA-16ZnxQu, MCM-41ZnxQu, където x=2 и 4%.

Резултатите от прахова рентгенова дифракция при малки ъгли на изходните силикатни материали показват типични рефлексии характерни за MCM-41 и SBA-16 материали.

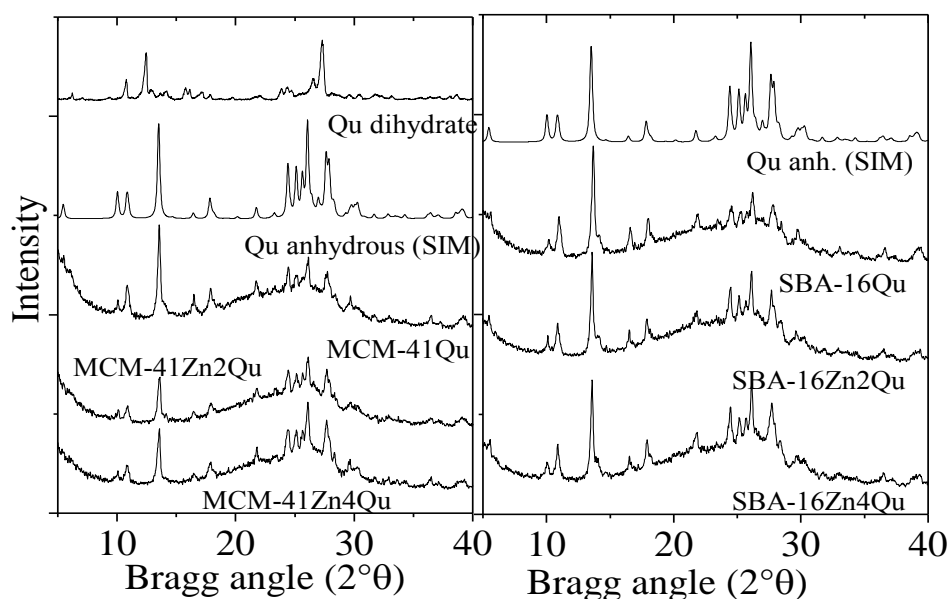
За носителите модифицирани с Zn се наблюдава леко намаляване на интензитета на рефлексите, което говори за намаляване на структурната подреденост, въпреки това не са наблюдавани характеристични ивици за кристален цинков оксид при големи ъгли.

Значително по-голямо намаление на интензитета се наблюдава за натоварени с кверцетин (Qu) изходни и модифицирани мезопорести силикати, което може да бъде обяснено не само с намаляването на количеството силикат в изследваната проба, но и с ефекта на запълване на порите с кверцетин.

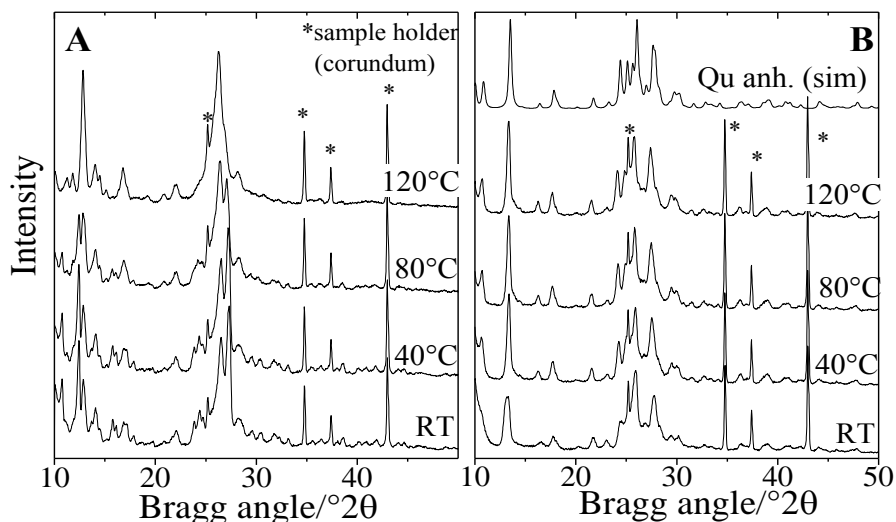
Праховите рентгенови дифрактограми снети при големи ъгли, на натоварените с кверцетин изходни и цинк съдържащи силикатни носители са представени на Фигура 16. Характеристични рефлексии за кверцетина се наблюдават при всички проби, което показва, че кверцетина не е само в порите, а и на външната повърхност на частиците или в междучастичковото пространство.

Три различни форми на кверцетин (дихидрат (P-1), монохидрат (P2₁/c) и анхидрид (P2₁/a)) могат да бъдат различени чрез направените симулирани рентгенографски изчисления от Cambridge Structural Database. При всички натоварени с кверцетин проби, без значение дали са модифицирани с Zn или не, кверцетинът се регистрира под формата на анхидрид. Това се дължи на неговата прекристализация в етанол по време на процедурата на натоварването му в силикатните носители. Този ефект е доказан чрез прекристализация на изходния кверцетин дихидрат в етанол и последващото му *in situ* термично третиране при различни температури до 120°C (Фигура 17). От направените изследвания може да се види, че кверцетинът е кристализирал в анхидридна форма при изпаряване на еталона още при стайна температура, а с повишаване на температурата се подобрява само кристалността.

Внимателното изследване на изходния кверцетин дихидрат показва, че този материал е смес от дихидрат и неизвестна полиморфна форма получена при нагряване на 120°C. Тази неизвестна полиморфна форма е също прекристализирана в анхидрид при разтварянето ѝ в етанол. Доказано също е, че анхидридът преминава в моно- или дихидратна форма при дълго излагане на влага при стайна температура. По литературни данни водоразтворимостта на дихидрата и анхидрида на кверцетин е сходна до 80°C. Изследванията показват, че разтворимостта на кверцетин анхидрид варира от 0.00215 g/L при 25°C до 0.665 g/L при 140°C, а на кверцетин дихидрата - от 0.00263 g/L при 25°C до 1.49 g/L при 140°C. Следователно, хидратното състояние в действителност не повлиява биологичната наличност на кверцетина при дермално приложение, но може да повлияе на неговите физико-химични свойства.

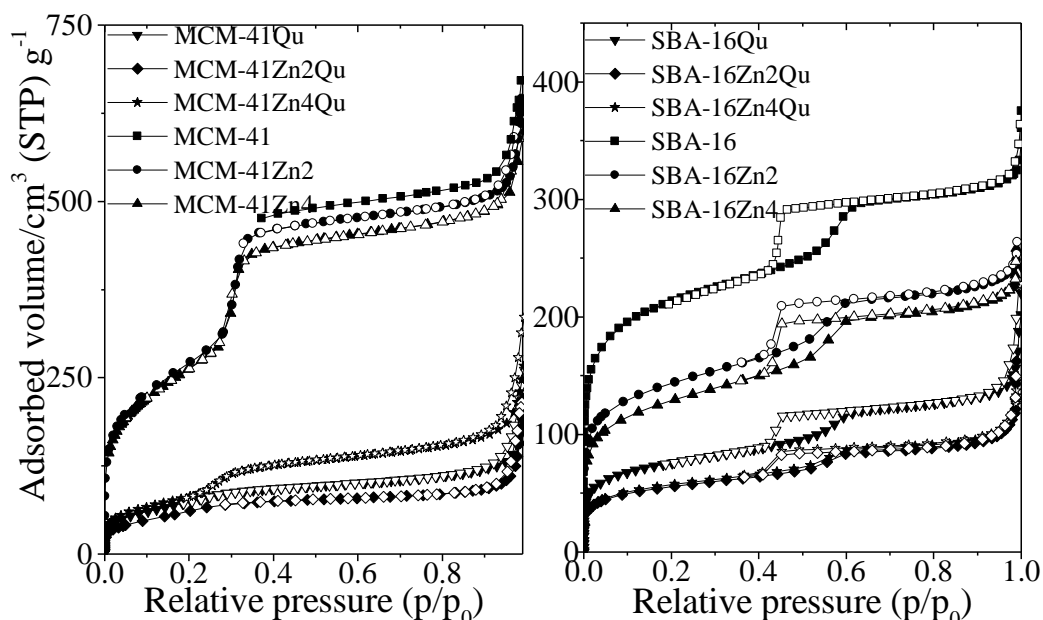


Фигура 16. Рентгенограми на кверцетин натоварен в изходни и цинк модифицирани MCM-41 и SBA-16 носители



Фигура 17. Рентгенограми на изходния кверцетин дихидрат (A) и на образца прецистализиран в етанол (B) при стайна температура, 40, 80, 120°C

Изотермите от направената азотна физисорбция на изходните, модифицираните и натоварени с кверцетин образци са представени на Фигура 18, а данните за текстуралните характеристики на изследваните материали са обобщени в Таблица 6. Изотермите за всички материали са тип IV, като за SBA-16 се наблюдават характерни хистерезиси за разлика от MCM-41. Текстурните характеристики на натоварените с кверцетин образци показват значително намаляване на специфичната повърхност и поровия обем, дължащо се на запълването на порите с кверцетин. Модифицирането с Zn води до намаляване на специфичната повърхност и поровия обем с около 30%. Модифицирането може да доведе до формирането на цинкоксидна фаза в каналчетата на мезопорестия силикат (виж UV-Vis, Фигура 20). SBA-16 има значително по-тесни входове на порите, които могат да бъдат блокирани от ZnO наночастици, в резултат на което би се възпрепятствало навлизането на Zn или кверцетин в тях. Регистрирането на ZnO частици с прахова рентгенова дифракция е невъзможно поради ниското им съдържание в пробата и малкия им размер (под 5 nm).



Фигура 18. Азотни адсорбционни и десорбционни изтерми на чистите силикати, Zn-модифицираните и натоварените с кверцетин проби

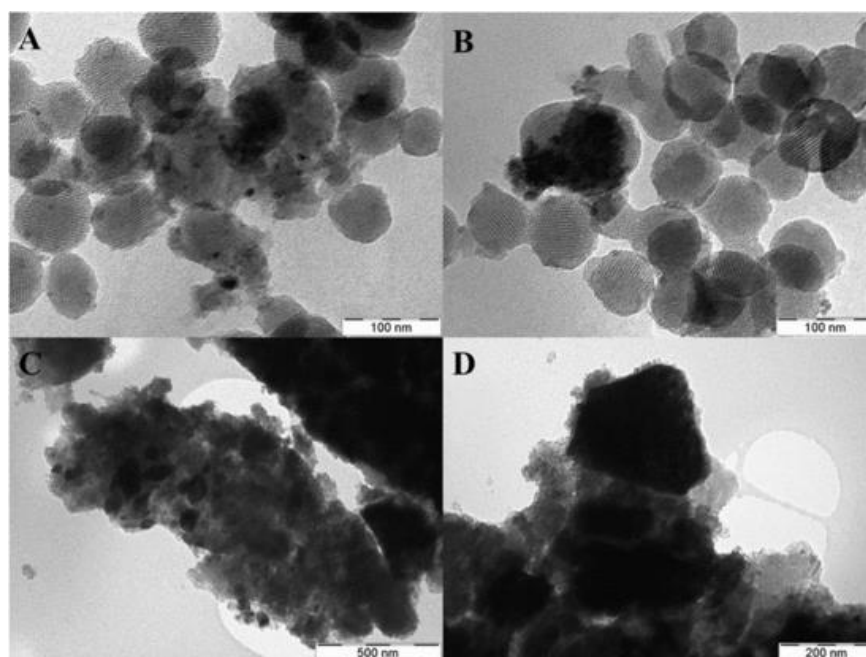
Таблица 6. Текстурални свойства на изследваните проби и количеството на кверцетин в изходните и модифицираните образци

Проба	ВЕТ, (m ² /g)	Обем на порите, (cm ³ /g)	Поров диаметър ^a (nm)	Съдържание на кверцетин (тегл.%)	Освободен Zn ^b , (%)
SBA-16	787	0.49	3.6	-	-
SBA-16Zn2	522	0.36	4.6	-	-
SBA-16Zn4	469	0.34	4.8	-	2,5
SBA-16Qu	276	0.21	3.5	41.1	-
SBA-16Zn2Qu	209	0.16	4.6	43.1	100
SBA-16Zn4Qu	203	0.16	4.6	45.0	43
MCM-41	1175	1.00	2.7	-	-
MCM-41Zn2	1005	0.99	2.7	-	-
MCM-41Zn4	977	0.90	2.7	-	-
MCM-41Qu	249	0.20	-	35.0	-
MCM-41Zn2Qu	222	0.25	-	41.8	95
MCM-41Zn4Qu	278	0.29	2.3	36.6	92

^a – среден диаметър на порите определен чрез ВЈН модел

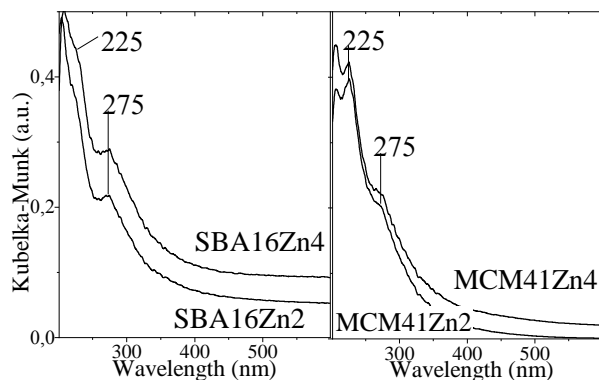
^b – *In vitro* освобождаване на Zn в буфер с pH=5.5

Запазването на морфологията на MCM-41 и SBA-16 частиците след модифицирането с Zn е изследвано с ТЕМ (Фигура 19). За SBA-16Zn4Qu се наблюдава наличието на по-големи Zn наночастици, което е в съответствие с получените резултати от UV–Vis изследванията (Фигура 20).



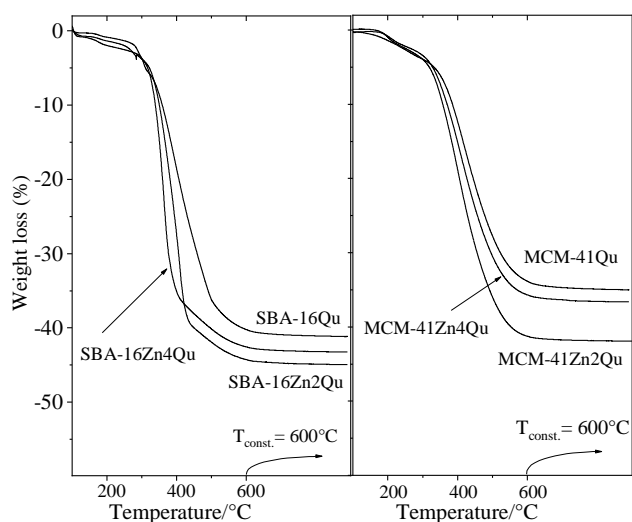
Фигура 19. ТЕМ изображения на MCM-41Zn4Qu (A, B) и SBA-16Zn4Qu (C, D) образци

Изследванията с дифузионно отражателната UV–Vis спектроскопия на модифицираните с цинк образци свидетелстват за формирането на наноразмерен ZnO. UV–Vis спектрите на изходните и Zn-модифицираните силикатни носители са представени на Фигура 20. При всички модифицирани с Zn образци се наблюдават абсорбционни ивици при 275 и 225 nm (Фигура 20). Ивици преди 230 nm обикновено се свързват с пренос на заряд от Zn към свързан в силикатната решетката O²⁻, когато металния атом е вграден в решетката, подобно на зеолитите. Аналогично на зеолитите, връзката около 280 nm може да бъде разглеждана, като капсулирани цинкоксидни наночастици с размер 1–2 nm. Поради тесните входове на порите (~2.5 nm) при SBA-16 се формират предимно ZnO наночастици на външната повърхност на силикатните частиците. Докато при MCM-41 носителите, йонната форма на Zn е доминираща, което вероятно се дължи на по-голямото количество на силанолни групи на повърхността при този тип структура. Тази разлика в разпределението на Zn специи в различните типове силикатни структури силно влияе на взаимодействието им с кверцетин.



Фигура 20. UV-Vis спектри на Zn-модифицирани MCM-41 и SBA-16 проби

Проведеният термогравиметричен анализ на Zn-модифицираните и натоварени с кверцетин проби (Фигура 21) показва ефективно натоварване на кверцетин във всички образци, като по-значително то е за системите на основата на модифицираните носители (до 45%, Таблица 6) в сравнение с изходните.



Фигура 21. Термогравиметричен анализ на кверцетин натоварен в чисти и модифицирани с Zn MCM-41 и SBA-16 силикатни носители

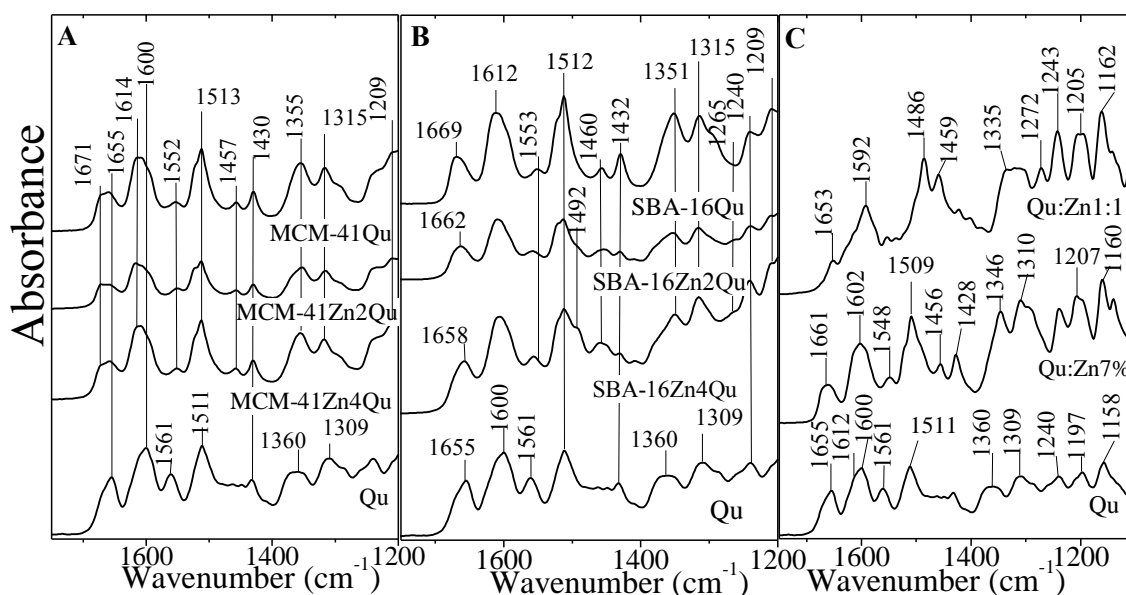
С цел изясняване на взаимодействието на молекулата кверцетин с мезопорестите носители всички натоварени образци са изследвани чрез ATR-FTIR (Фигура 22). Чистият кверцетин се характеризира с ивици за арил кетон ($\nu_{(C=O)}$ при 1655 cm^{-1}) и за ароматния пръстен $\nu_{(C=C)}$ (при 1600 , 1561 , 1511 и 1432 cm^{-1}). Ивицата при 1360 cm^{-1} е свързана с ОН вибрации на фенолите, докато ивицата около 1309 cm^{-1} може да бъде свързана с вибрационни трептения на ароматните С-Н.

След натоварването на кверцетин в MCM-41 се наблюдават отмествания за ивиците при 1655 cm^{-1} и 1600 cm^{-1} . Освен това се увеличава интензитета на ивицата за ОН на феноли около 1360 cm^{-1} , което говори за взаимодействие между силанолните групи на MCM-41 и фенолните групи на кверцетина, което води до загуба на вътрешномолекулна връзка между ароматния и пирановия пръстен. Спектралните характеристики за SBA-16Qu са сходни с тези за MCM-41Qu. В присъствие на Zn обаче спектърът е различен. За детайлно изследване на взаимодействието кверцетин-цинк при процедурата на импрегниране с Zn е приложена същата процедура за получаване на Qu:Zn в същото съотношение и в отсъствие на носител (Qu:Zn=7%) (Фигура 22C). При спектъра на Qu:Zn=7% слабо отместване на ивиците за $\nu_{(C=O)}$ и $\nu_{(C=C)}$ доказва координирането на Zn към кверцетина. Освен това, се появяват нови ивици при 1456 и 1207 cm^{-1} , което показва, че поне една ОН група участва в координирането. За Qu:Zn=1:1 комплекса $\nu_{(C=O)}$ ивицата е значително по-слабо интензивна, докато се появява нова ивица при 1272 cm^{-1} , отговаряща за $\nu_{(C-O)}$. Това

предполага, че координирането на металния йон се осъществява между карбонилна група и ОН група на цикъл С (Схема 5).

Отместванията на ивиците за C=C от ароматния пръстен са по-ясно изразени, което предполага по-силна координация. В спектрите на Zn модифицираните SBA-16 образци се наблюдава появата на слабоинтензивни ивици при 1492, 1461 и 1265 cm^{-1} , свързващи се с формирането на Zn-кверцетин комплекс с участието на ОН и C=O групите (Схема 5, Комплекс 2).

В заключение, ATR-FTIR спектроскопските изследвания доказват, че при немодифицираните мезопорести силикати кверцетина е координиран посредством неговите фенолни групи към силанолните групи от силикатната матрица, чрез водородни връзки. В присъствие на Zn на повърхността на силиката или под формата на наночастици в порите, се образува комплекс Zn-кверцетин основно чрез фенолни групи. Интересно е да се отбележи, че в случай на Zn модифициран SBA-16, кето групата от молекулата на кверцетина също участва в координацията, вероятно в резултат на по-силно взаимодействие (Схема 5).



Фигура 22. ATR-FTIR спектри на кверцетин и натоварен кверцетин в изходни и цинк модифицирани MCM-41 и SBA-16 проби

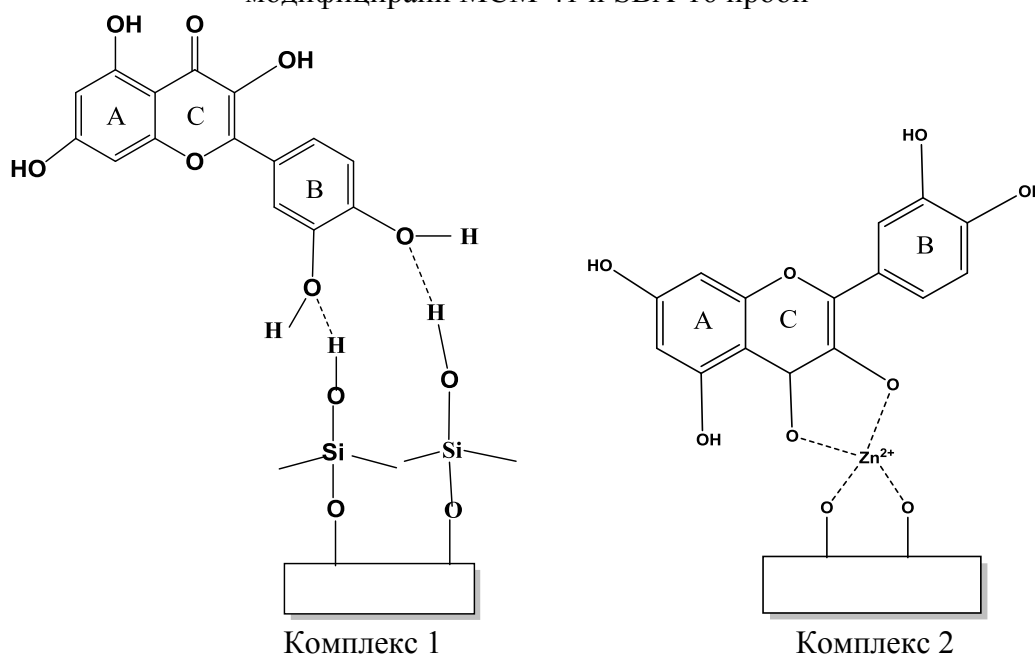
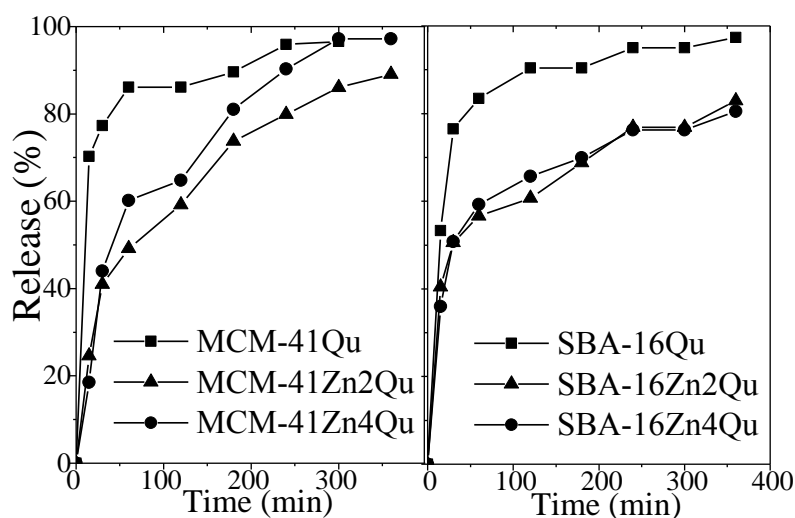


Схема 5. Комплекси на кверцетина със силанолните групи на силиката (комплекс 1) и с цинк от повърхността на модифицираните носители (комплекс 2)

In vitro освобождаването на кверцетин от всички разработени системи е изследвано във фосфатен буфер с рН=5,5, каквото е физиологичното рН на кожата (Фигура 23). За немодифицираните мезопорести силикати се наблюдава бързо освобождаване на значително количество кверцетин в рамките на първия половин час, докато при модифицираните освобождаването е забавено. За системите на основата на Zn съдържащите носители имаме пълно освобождаване на кверцетина от MCM-41 и освобождаване до 80% от SBA-16, като разликата в освобождаването при различните носители вероятно се дължи на структурните особености на порите им и комплексообразуването, за което свидетелстват направените ATR-FTIR изследвания. Освободеното количество цинк се повишава значително при образците натоварени с кверцетин. При изходния SBA-16Zn4 носител освобождаването на цинк е едва 0.05 mg/L, което отговаря на 2.5% от общо съдържание на цинк. Докато при наличието на кверцетин освободеното количество се повишава значително (Таблица 6) и стига до 43–100%. Този ефект вероятно е свързан с формирането на Zn-кверцетин комплекс, което значително подобрява освобождаването на метални йони от силикатните носители. Количество освободен цинк от Zn-SBA-16 е по-голямо от това за Zn-MCM-41. Тези наблюдения са в съответствие с получените резултати от ATR-FTIR изследванията, което предполага формирането на комплекс Zn-кверцетин преимуществено в SBA-16 структурата. Това може да бъде обяснено с формирането на по-голямо количество йонни цинкови специи ($\equiv\text{Si-O-Zn-O-Si}\equiv$) включени в силикатната решетка на MCM-41, което се потвърждава и от UV-Vis спектрите. Освобождаването на цинк е по-слабо за пробите съдържащи по-голямо количество от метала и при двата носителя. Този ефект може да бъде обяснен с образуването на наночастици цинков оксид, блокиращи порите на носителите, което води до ограничен достъп на кверцетин в тях.

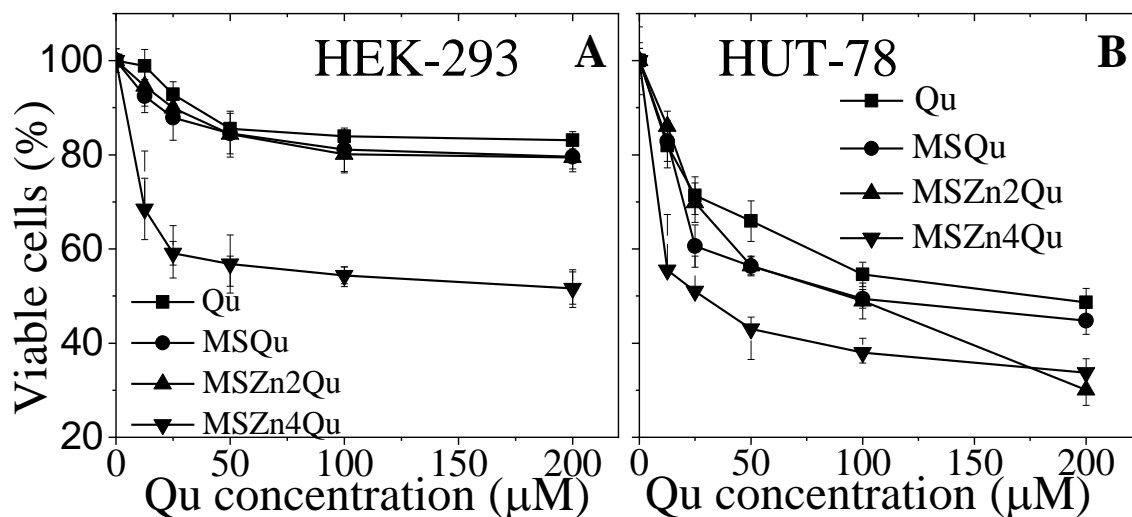


Фигура 23. *In vitro* освобождаване на кверцетин от изходни и цинк-модифицирани SBA-16 и MCM-41 образци при рН=5.5.

Цитотоксичният потенциал на мезопорестите силикати е определен върху две човешки клетъчни линии с различен произход, а именно доброкачествени HEK-293 и малигнени HUT-78. Двете клетъчни линии са избрани с цел да се определи селективността на цитотоксичност спрямо туморните клетки, както на разработените от нас системи, така и на свободното лекарствено вещество. HEK-293 са човешки ембрионални бъбречни клетки, докато HUT-78 са малигнени клетки, подходящ модел на кожен Т-клетъчен лимфом (CTCL). Характерна особеност на CTCL е изразена свръхактивност на JAK-3 киназа. Експериментално е доказано, че кверцетина може селективно да инхибира тази свръхекспресия, което го прави потенциално лекарство за локално лечение на кожен Т-клетъчен лимфом.

Кривите, представящи зависимостта концентрация-ефект са показани на Фигура 24 и съответните инхибиращи концентрации (IC_{50}) са обобщени в Таблица 7. Чистите силикати не предизвикат значително намаляване на клетъчната жизнеспособност на

доброкачествените HEK-293 клетъчни линии дори в големи дози от 1 mg/ml. Цитотоксичността на кверцетина натоварен в мезопорестите носители е сравнена с ефекта върху клетъчната пролиферация на свободното вещество. Както показват графиките кверцетинът и Zn-съдържащи носители не показват инхибиращ ефект върху клетъчната пролиферация на нормалните HEK-293 клетки. Кверцетинът натоварен в SBA-15Zn4 дори в най-високите концентрации на третиране не достига 50% потискане на клетъчната жизненост, IC₅₀ не се достигат. При злокачествените HUT-78 клетки обаче всички тествани системи се характеризират с изразена зависимост на цитотоксичния ефект от концентрацията. Тези резултати показват, че изследваните системи натоварени с кверцетин проявяват висока селективност срещу туморни клетки и са безвредни за здравите. Също така, от направените изследвания, може да се заключи, че кверцетина натоварен в мезопорести материали превъзхожда по отношение на цитотоксична активност чистото вещество спрямо туморни клетки. Кривите, отразяващи зависимостта концентрация-ефект са отместени към по-ниски концентрации и съответните IC₅₀ са приблизително два пъти по-ниски в сравнение с тези на етанолен разтвор на кверцетин. Този ефект е по-силно изразен при модифицираните натоварени с кверцетин силикати. При Zn-съдържащите системи се достига до повече от 70 % клетъчна смърт при високите концентрации на кверцетина - 200 μM.



Фигура 24. Зависимост концентрация-ефект определени чрез MTT-тест

Таблица 7. Еквиефективни концентрации на нанесен спрямо свободен кверцетин

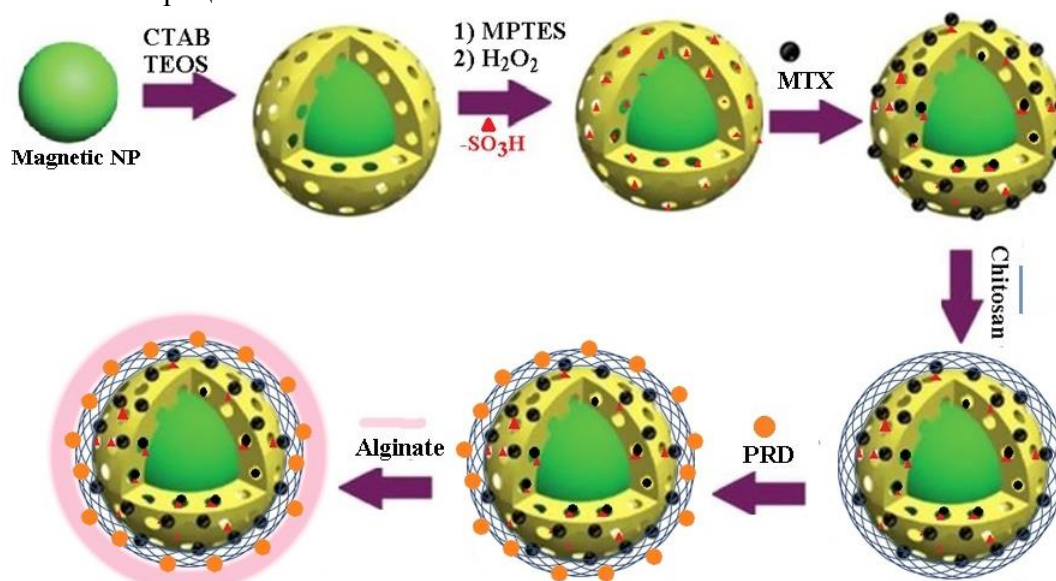
Клетъчна линия	IC ₅₀ (μM)			
	Кверцетин	MSQu	MSZn2Qu	MSZn4Qu
HEK-293	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HUT-78	174.8	95.14	91.3	26.5

*MS-мезопорест силикат

3. Разработване на двукомпонентна лекарствена система с преднизолон и митоксантрон на основата на магнитни желязооксидни/силикатни наноконпозити

През последните няколко години ЛДС на основата на магнитни наночастици са обект на все по-силен интерес поради тяхното потенциално приложение в медицината за диагностика и лечение. Те могат да бъдат използвани като средство за получаване на контрастни изображения (magnetic resonance imaging), за лечение чрез предизвикана магнитна хипертермия и за магнитно контролирано лекарствено доставяне.

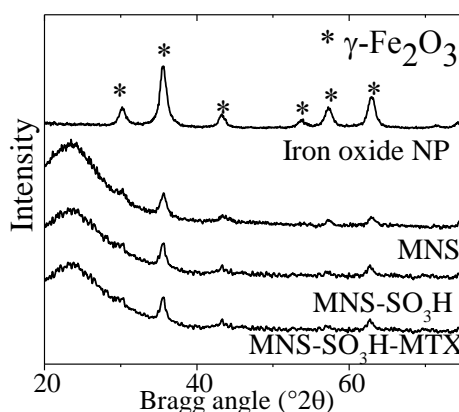
Нова перспектива в разработването на доставящи системи за противотуморни вещества предоставят наноконпозити изградени от магнитни и силикатни наночастици. Чрез внасянето на магнитни нанокристали в структурата на мезопорестите силикати, могат да се получат оригинални ЛДС, позволяващи селективно доставяне и освобождаване на ЛВ в прицелния орган или тъкан, при прилагане на външно магнитно поле. Митоксантронът (MTX, Схема 6) е противотуморно лекарство, което се използва със значителна ефективност при лечението на рак на гърдата и простатата. Въпреки доказаните терапевтични свойства на това вещество, неговото клинично приложение е ограничено поради сериозните проблеми, свързани с неговата токсичност. Поради този факт изследванията с митоксантрон са насочени главно към намаляване на неговите странични ефекти чрез понижаване на дозировката и ограничаване на натрупването му в нецелевите тъкани. Използвани са редица подходи за приготвяне на ефективни доставящи системи за митоксантрон, но често се наблюдава нисък капацитет на натоварване и невъзможност за контрол на освобождаването. Един от подходите за преодоляване на тези недостатъци е използването на силикатни носители с подходящото функционализиране на повърхността, което може да доведе до повишаване ефективността на натоварване и да позволи последващото обвиване на натоварените частици с полимерни слоеве. Изграждането на обвивка от полимери с естествен произход може значително да подобри биосъвместимостта и биоадхезивните свойства на системата и да осигури контролирано освобождаване на ЛВ. Често при терапия с противотуморни се прилагат и противовъзпалителни вещества, с цел да се повлияят възпалителните процеси, съпътстващи основното заболяване. Добре познато и често прилагано противовъзпалително лекарствено вещество е глюкокортикоидът преднизолон (PRD, Схема 7). Самият той в продължение на три десетилетия, е прилаган самостоятелно в големи дози като противотуморна терапия. Комбинирането на тези две ЛВ е обещаваща стратегия за лечение на туморни заболявания в напреднал стадии съпроводени с възпалителни процеси.



Първата стъпка при разработване на двупомпонентната лекарствена система е получаването на наноразмерен магнетит, което е постигнато чрез модифициране на стандартна процедура на съутаяване на желязни хлориди при стайна температура. За изграждане на желязооксидните/силикатни композитни наночастици (MSN) е разработена

процедура, при която към разтвор на получените желязооксидни частици се прибавят структуроопределящ агент (СТАВ) и източник на силиций (TEOS). Получените материали са функционализирани със SO_3H групи в дружъпкова следсинтезна процедура и означени MNS- SO_3H . Митоксантронът е нанесен в модифицираните носители от воден разтвор, като продуктът (MNS- SO_3H -MTX) е изолиран посредством центрофугиране. Следващата стъпка е обвиване на натоварените частици с хитозан от разтвор, като пробите са означени MNS- SO_3H -MTX-CH. За нанасянето на преднизолон е използван метод на импрегниране с омокряне, като е избран подходящ разтворител (метанол), които да не засегне изградения полимерен слой от хитозан. Получените проби са означени, като MNS- SO_3H -MTX-CH-PRD. В последната стъпка за получаването на ЛДС сме обвили частиците, натоварени с две ЛВ, със слой от алгинат. За целта разтвор на полимера е прибавен капка по капка при непрекъснато разбъркване до сухо. Получените доставящи системи са означени - MNS- SO_3H -MTX-CH-PRD-ALG.

Рентгеновите дифрактограми на наноразмерните желязооксидни частици, магнитните желязооксидни/силикатни наноконпозити (MNS) и техните модифицирани със сулфонови групи и натоварени с митоксантрон аналози са представени на Фигура 25. Те показват уширени рефлексии характерни за желязооксидните наночастици, които могат да бъдат приписани по-скоро на магхемитна структура, отколкото на магнетитна. Направените изчисления показват около 20% съдържание на магнетит, но рефлексите са напълно припокрити поради малкия размер на частиците. Размерът на частиците изчислен по уравнението на Scherrer е 11 nm. XRD рефлексите за MNS показват наличие на наноразмерен магхемит с по-нисък интензитет, но със същата стойност на полуширината на пиковите (Фигура 25). Рентгеноструктурният анализ при малки ъгли на MNS материалите показва рефлексии за $d_{100}=4.18$ nm, типични за подредена структура на мезопорести силикатни материали с параметър на елементарната клетка $a_0=4.82$ nm. След модифицирането със сулфонови групи не се наблюдават промени в рентгеновите дифрактограми при големи ъгли, но интензитетът за рефлексии при малки ъгли намалява, което говори за загуба на структурна подреденост. За натоварените системи не се наблюдават характерни рефлексии за митоксантрон, което означава че ЛВ е натоварено в порите и не е на външната повърхност на силикатния носител.



Фигура 25. Рентгенограми на изследваните проби

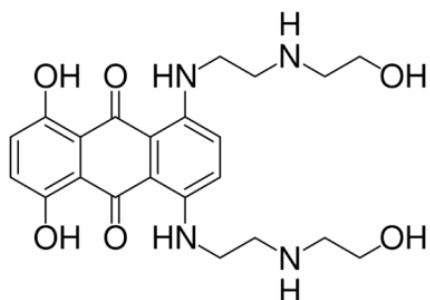


Схема 6. Структура на молекулата митоксантрон

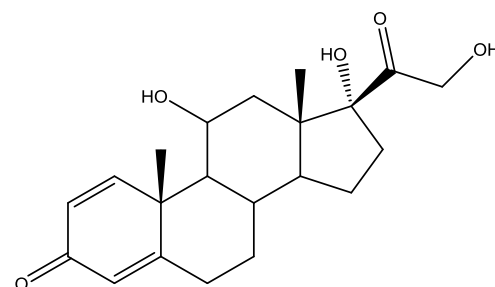
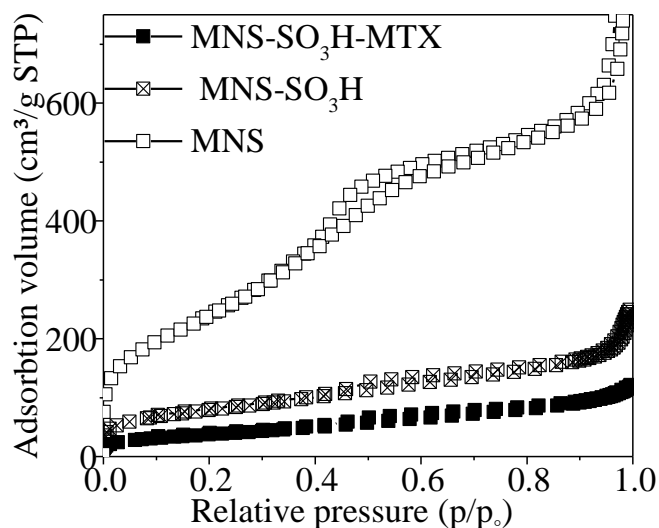


Схема 7. Структура на молекулата на преднизолон

Текстурните параметри на изходния MNS композитит, SO₃H-модифициран и натоварен с митоксантрон носител са изследвани чрез N₂-физисорбция (Фигура 26), а изчислените данните са представени в Таблица 8. Полученият MNS нанокompозит се характеризира с изотерма тип IV с хистерезис тип H1-H2. Изходният материал показва висока специфична повърхност и поров обем, въпреки че формата на хистерезиса е по-скоро типична за мезопорест силикат с пори с широко разпределение по размер. В съответствие с резултатите от праховата рентгенова дифракция при модифицирането със сулфонови групи се наблюдава значително намаляване на специфичната повърхност и поровия обем. Този ефект може да бъде обяснен с няколко фактора, като намаляване размера на порите поради реакцията на 3-маркаптопропил триметоксисилана (MPTMS) с повърхността на силикатните стени или с ефекта на блокиране на входовете на порите от хидролизирани силани. Не може да бъде изключена и възможността за намаляване на подредеността на поровата структура поради влиянието на водородния пероксид върху силиката по време на стъпката на окисление при модифицирането със сулфонови групи. След натоварването на митоксантрон поровият обем и специфичната повърхност също намаляват, което е индикация за запълване на порите с молекули на ЛВ. След обвиването с полимер се наблюдава пълно блокиране на порите и чрез азотна физисорбция може да бъде измерена само външната повърхност на частиците, която е около 10 m²/g.

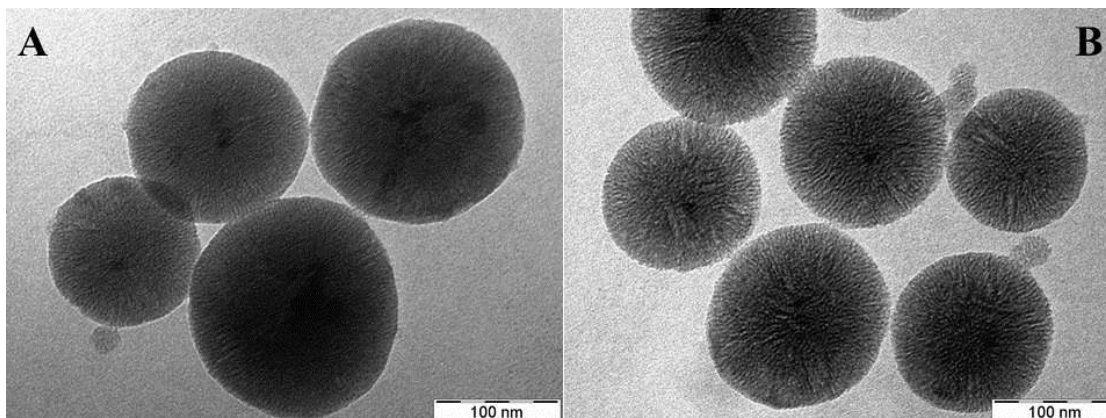


Фигура 26. Изотерми на адсорбция и десорбция на азот на изследваните проби

Таблица 8. Текстурни характеристики и съдържание на сулфонови групи и лекарство вещество

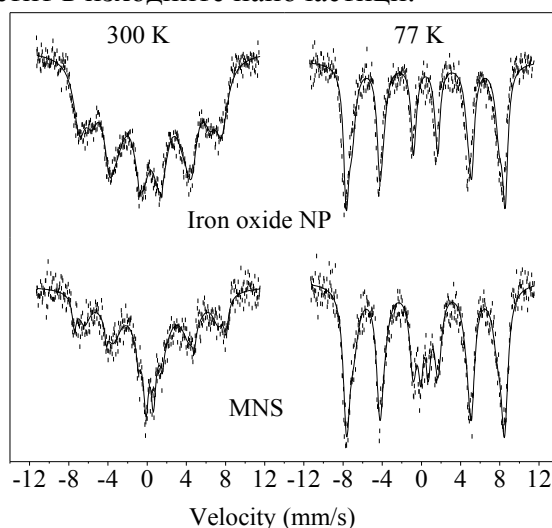
Проба	ВЕТ (m ² /g)	Обам на порите (cm ³ /g)	Поров диаметър ^a (nm)	SO ₃ H/лекарство (тегл.%)
Fe ₃ O ₄ /MS	825	0.94	3.45	-
Fe ₃ O ₄ /MS-SO ₃ H	285	0.25	1.32	9
Fe ₃ O ₄ /MS-SO ₃ H/MXT	135	0.13	-	9/6

Получаването на сферични MNS наночастици с размери между 80-100 nm е потвърдено от изследвания с TEM (Фигура 27). Получените изображения са в добро съответствие с резултатите от азотната физисорбция, показвайки формирането на подредени мезопори. Могат да бъдат наблюдавани и радиално разположени каналчета в сферичните частици. Образуването на агломерати от желязооксидни наночастици не се наблюдава, а при по-голямо увеличение могат да се видят и желязооксидните частици с размер ~10 nm в ядрото на силикатните сфери. Тези резултати потвърждават успешното въвеждане на фино-дисперсни магнитни наночастици в мезопорестия силикатен материал.



Фигура 27. ТЕМ изображения на MNS образци (А-В)

Резултатите от Мьосбауерова спектроскопия също потвърждават наличието на магхемитни нанокристали в силикатната структура. При сравнение на спектрите снети при 300 и 77 К ясно се вижда преимущественото присъствие на суперпарамагнитни магхемитни наночастици (Фигура 28). При първия подход спектрите се разлагат на два секстета в съответствие с двете различни възможни координации на желязните йони в магхемита (тетраедрична и октаедрична – Таблица 9). Малкият размер на частиците повлиява суперпарамагнитното поведение, т.е. намаляването на температурата на измерване води до увеличаване на степента на магнитно подреждане - наличието на антиферомагнитни секстети е по-изразено в спектъра снет при 77 К. По-специално, суперпарамагнитни двойки се появяват както при 300 К, така и при 77 К в спектъра на MNS, което потвърждава, че размерът на магнитните частици е около 11 nm. Получените стойности на изомерно отместване ($0.35 < IS_{300K} < 0.41$ mm/s) са характерни по-скоро за Fe^{3+} окислително състояние (Таблица 9), докато присъствието на магнетит с Fe^{2+} в 1/3 от катионите би повишило IS_{300K} стойностите на съответния секстет до ~ 0.6 mm/s. Получените резултати са в съответствие с данните от праховата рентгенова дифракция, определящи $\sim 20\%$ магнетит в изходните наночастици.

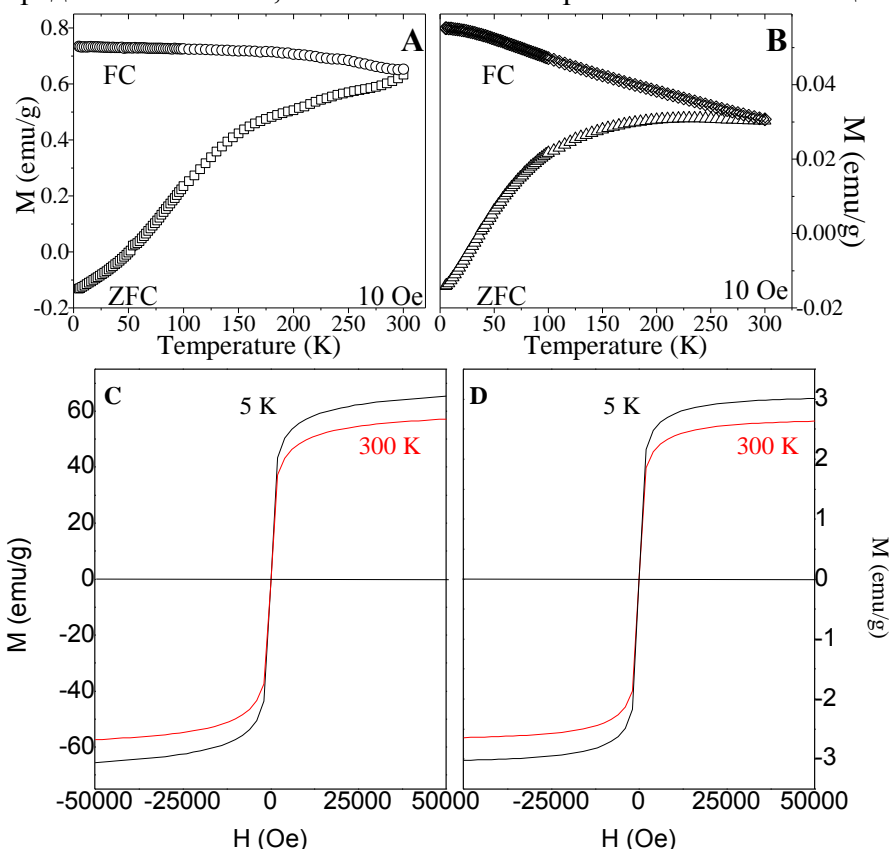


Фигура 28. Мьосбауерови спектри на изходните желязо-оксидни наночастици и MNSкомпозитите

Таблица 9. Мьосбауерови параметри на изходните желязооксидни наночастици и MNS композитите

Проба	300 K					77 K			
	Comp	IS	QS	MHF	RI	IS	QS	MHF	RI
желязооксидни наночастици	Sext(1)	0.35	-	45.6	24	0.44	-	50.5	54
	Sext (2)	0.37	-	38.5	76	0.41	-	46.9	46
MNS	Sext(1)	0.34	-	47.7	10	0.42	-	50.1	61
	Sext (2)	0.41	-	42.0	78	0.43	-	45.6	29
	Doubl	0.26	0.73	-	12	0.32	0.76	-	10

Магнитните свойства на получените желязооксидни наночастици и композитните материали са доказани чрез измерване на магнетизацията. Кривите на намагнетизиране получени при ZFC (охлаждане в нулево магнитно поле) и FC (охлаждане в магнитно поле) режими за изходните желязооксидни частици и композитните материали са представени на Фигура 29. Кривите на охлаждане в нулево поле на изходните желязооксидни частици показват интервал на блокиращата температура (T_b) и следователно широко разпределение по размер на магнитните частици. Налични са както частици със суперпарамагнитни, така и с феромагнитни свойства при стайна температура. Немагнитната обвивка може да отдели магнитните ядра на по-малките частици, показващи суперпарамагнитно поведение. Формата на ZFC кривите на MNS материали е малко по-различна от тези на магнитните наночастици и също показва широко разпределение на T_b и широко разпределение по размер на частиците. MNS материалите имат по-малка средна температура на блокиране, отколкото изходните магнитни наночастици. Този ефект може да бъде свързан с факта, че за MNS материалите магнитните частици са по-разделени поради обвиването им със силикат. Ние установихме, че средната блокираща температура не намалява драстично след обвиването със силикат на изходните желязооксидни частици, което предполага, че те са били вече разделени една от друга чрез слабомагнитна или немагнитна обвивка. Ние предполагахме, че тази ядро/обвивка структура на наночастици и разпределението по размер на магнитните ядра определя разпределението на T_b , а не магнитното свързване на наночастиците.

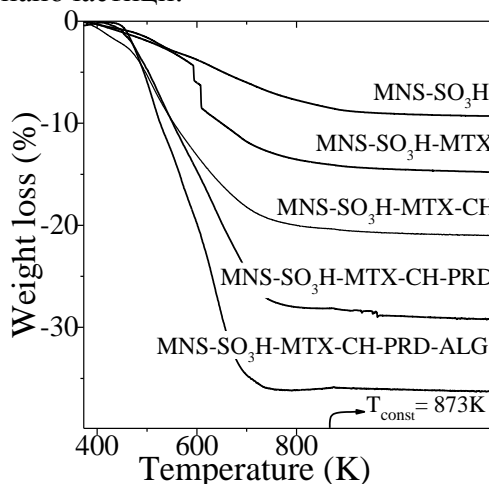


Фигура 29. Кривите на ZFC (охлаждане в нулево магнитно поле) и FC (охлаждане в магнитно поле) за желязо-оксидните наночастици (A) и MNS композитен материал (B) при прилагане на 10 Oe магнитно поле и хистерезис на магнетизация при 5 K и 300 K за (C) желязо-оксидните наночастици и (D) MNS материал

Магнитните хистерезисни криви, получени при 5 и 300 K за двете изследвани проби са представени на Фигура 29. Обратимостта и симетрията на кривите и при двете температури потвърждават парамагнитния характер на изследваните проби. Магнетизацията (M_s) при стайна температура за нашите магнитни наночастици е 57.3 emu/g, която е със 17.7 emu/g по-ниска стойност, отколкото за обемен магхемит (75 emu/g), но е в съответствие с данните за M_s стойностите на 10 nm окислени магнитни частици вариращи от 52-62 emu/g. Намалената магнетизация при насищане на

наночастиците железен оксид по отношение на обемния магнетит може да бъде обяснена чрез структурата ядро/обвивка със слабо- или немагнитна обвивка. Кривата на намагнитване на MNS материала показва подобен профил, като тази на магхемитните наночастици и стойностите за магнетизация на насищане съответстват на "разреждането", т.е. по-ниското количество желязо в пробата (4.3 об.%). Накратко, измерванията на магнетизацията показват, че чрез приложения метод на синтез могат да се получат композити от типа магнитни желязооксидни/силикати наночастици с изразена реакция в магнитно поле, което дава възможност да се повиши концентрацията на носителя в туморните тъкани при прилагане на външно магнитно поле.

Данните получени от термогравиметричните изследвания показаха, че използваният метод за модифициране води до получаване на 9 тегл. % пропилсулфонови групи, което отговаря на ~ 0.7 mmol/g сулфонови функционални групи на повърхността или в порите на MNS частиците (Фигура 30). Натоварването на 7.4 тегл.% митоксантрон води до наличието на 6 тегл.% ЛВ в модифицирания силикатен носител (Таблица 10). Разликата в нанесеното и регистрираното количество митоксантрон вероятно се дължи на процедурата на отделяне на силикатните частици от разтвора чрез центрофугиране. Според данни в литературата нужното терапевтично количество на митоксантрон в лекарствена система е около 6 тегл.%. TGA е използван и за количествено определяне на полимерните слоеве, образувани около натоварените частици. Първото обвиване с полимер е извършено чрез добавяне на разтвор на хитозан в мравчена киселина към MNS-SO₃H-MTX последвано от изпаряване на разтворителя. Както лекарството, така и силикатният материал са устойчиви на слабокиселинни условия, поради което се използва мравчена киселина като среда за обвиване на частици с хитозан. В допълнение, обвиването с хитозан е благоприятствано от взаимодействието на противоположно заредените полимер и сулфонови групи от повърхността на силикатните частици. Съдържанието на хитозан в MNS-SO₃H-MTX-CH е изчислено 6.3 тегл.% чрез коригиране на загубата на тегло от пропилсулфоновите групи и митоксантрона (Таблица 10). След обвиването с хитозан, 8 тегл.% преднизолон е натоварен в MNS-SO₃H-MTX-CH чрез метод на омокряне. Последващото обвиване с алгинат води до образуването на втори полимерен слой - 6.7 тегл.%. Формирането на полиелектролитен комплекс между хитозан и алгинат, както и неговото приложение в лекарство доставящи системи е широко изследвано направление в литературата, като в случая е използван в комбинация с магнитни желязооксидни/силикатни наночастици.

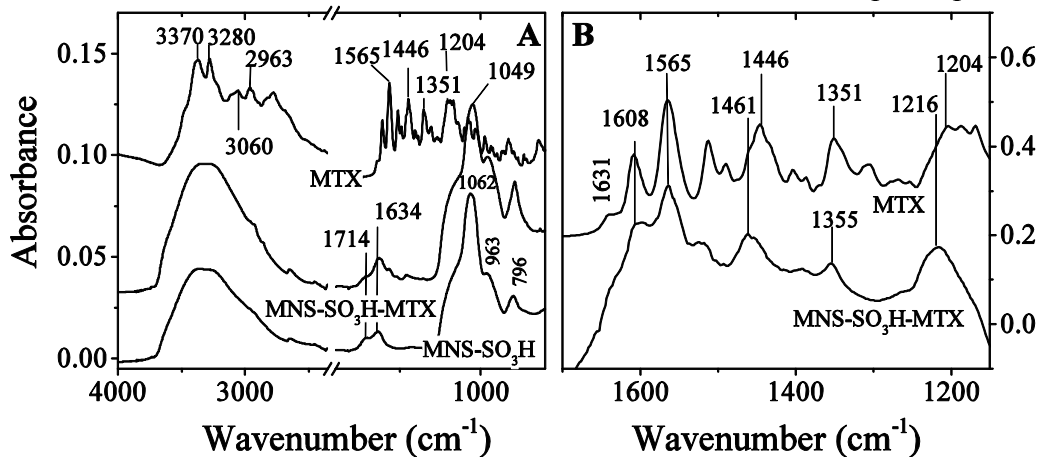


Фигура 30. Термогравиметричен анализ на функционализирани, натоварени с ЛВ и обвити с полимери композитни носители

Таблица 10. Текстури характеристики на изходни и натоварени с ЛВ MNS-SO₃H образци

Проба	BET, (m ² /g)	Обем на порите, (cm ³ /g)	Поров диаметър ^a , (nm)	SO ₃ H/MTX, (тегл.%)
MNS	825	0.94	3.45	-
MNS-SO ₃ H	285	0.25	1.32	9
MNS-SO ₃ H-MXT	135	0.13	-	9/6

Взаимодействието между силиката, сулфоновите групи и МТХ е изследвано чрез ATR-FTIR спектроскопия (Фигура 31А). Спектърът за MNS-SO₃H показва типични спектрални характеристики за силикат с доминиращи широки ивици за Si-O-Si при около 1062 cm⁻¹. При 1379 cm⁻¹ се наблюдава наличието на много слабо изразена ивица за сулфонови групи (ν_{S=O}). Широката и интензивна абсорбционна ивица за -OH при около 3400 cm⁻¹ може да се дължи и на присъствието на S-OH. Характеристични ивици за S=O и -SO₃H съответно около 1160 и 1080 cm⁻¹, са маскирани от силните Si-O-Si сигнали от силикатната матрица. По същия начин слабата ивица около 571 cm⁻¹ за Fe-O на магхемита е припокрита.

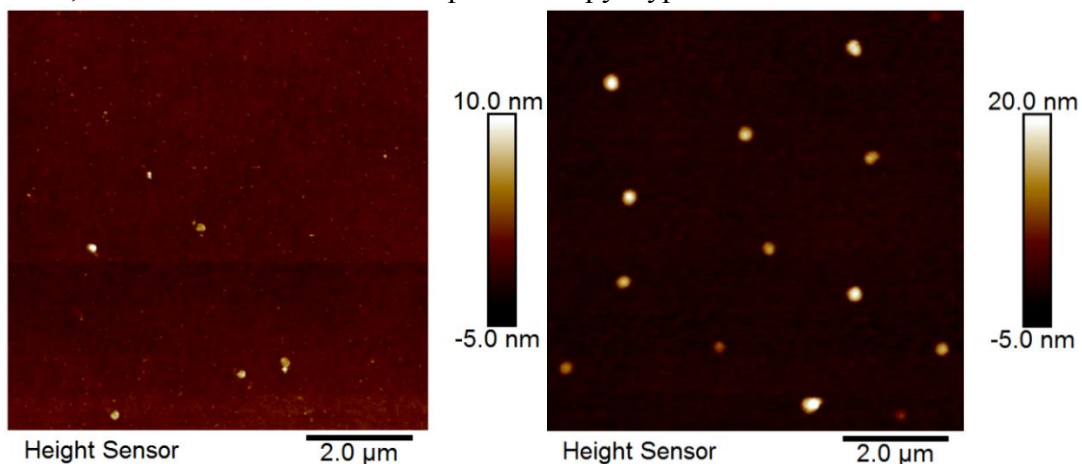


Фигура 31. ATR-FTIR спектри на чист модифициран със сулфонови групи и на натоварен с митоксантрон носител

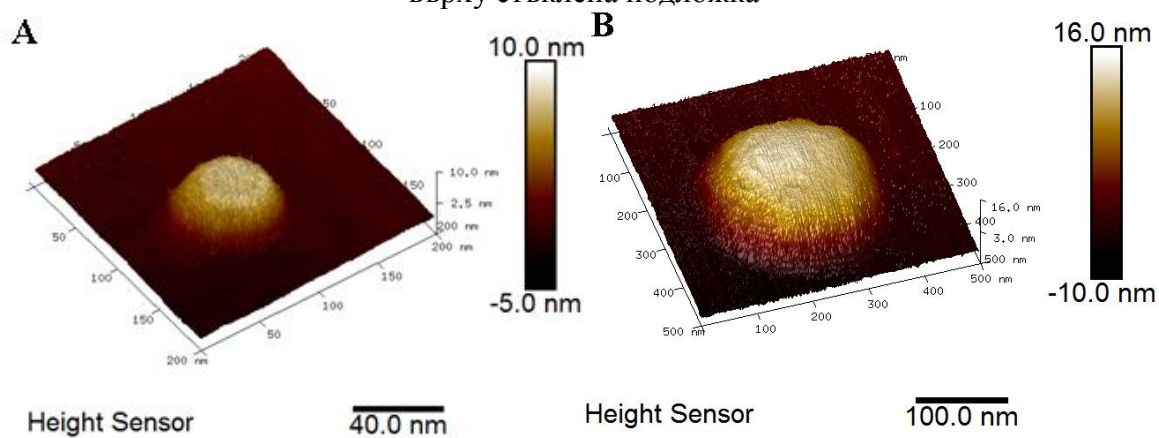
Митоксантронът е антрацендионово лекарство, което показва характерни инфрачервени ивици на ароматни пръстени (3060, 2963, 1608, 1565 cm⁻¹) и на N-H и C-O валентни трептения (1550-1000 cm⁻¹) (Фигура 31B). В спектъра за MNS-SO₃H-MTX също се наблюдават слабо изразени ивици за митоксантрон. За ивиците преписани на МТХ е използвана аналогията му с хинон и антраценохинон. Съответно за ивицата при 1608 cm⁻¹ на хинон кетони наблюдаваме същественото отместване в дължината на вълната, което вероятно се дължи на образуването на силни вътре- и междумолекулни водородни връзки. Ивиците при 1565 и 1513 cm⁻¹ принадлежат на скелетни C=C вибрации. Ивиците при 1446 и 1351 cm⁻¹ са свързани с комбинацията от C-O валентни (ν_{C-O}) и N-H деформационни (δ_{NH}) трептения. Пикът около 1204 cm⁻¹ може да се свърже с C-N валентни трептения. При натоватването на МТХ в MSN не се наблюдават изменения за скелетните вибрации на антраценодиона. Промените в позициите на вибрационните ивици за δ_{N-H} и ν_{C-O}, вероятно произхождат от страничната верига на молекулите на МТХ, предполагайки, че тази част може да бъде включена във взаимодействие с MNS-SO₃H.

Морфологията на повърхността на изходните композитни наночастици и получените ЛДС (Фигура 32) са изследвани с помощта на атомносилова микроскопия. Фигура 32А представя AFM изображенията на MNS частици върху стъклена подложка. Изходните композитни материали са сферични с размер на частиците 105±17 nm. Осредняването е извършено след измервания на 8 частици. В допълнение 3D изображенията на единична частица (Фигура 33А) и нейният напречен разрез (Фигура 34А) визуализира неравната повърхност на мезопорестата структура. След натоварването с двете ЛВ и обвиването с два полимерни слоя частиците запазват сферичната си форма. Техните размери изчислени от AFM изображенията са в диапазон 270 -340 nm (Фигура 32B). Фигура 34B представя напречен разрез на получените ЛДС. Преди приложението на уравнението за деконволюция оцененият среден размер на частиците е 209±23 nm за MNS-SO₃H-MTX-CH-PRD-ALG. Осредняването е извършено на 13 частици представени във Фигура 34B. Нарастващият размер на обвитите с полимери частици се приписва на процедурите за модифициране на повърхността на силиката чрез въвеждане на функционални групи, натоварването с ЛВ и обвиването с полимери. Допълнителна информация за повърхностната морфология на частицата може да бъде получена от 3D AFM изображенията на единичен обект (Фигура 33B). Повърхността е станала по-гладка

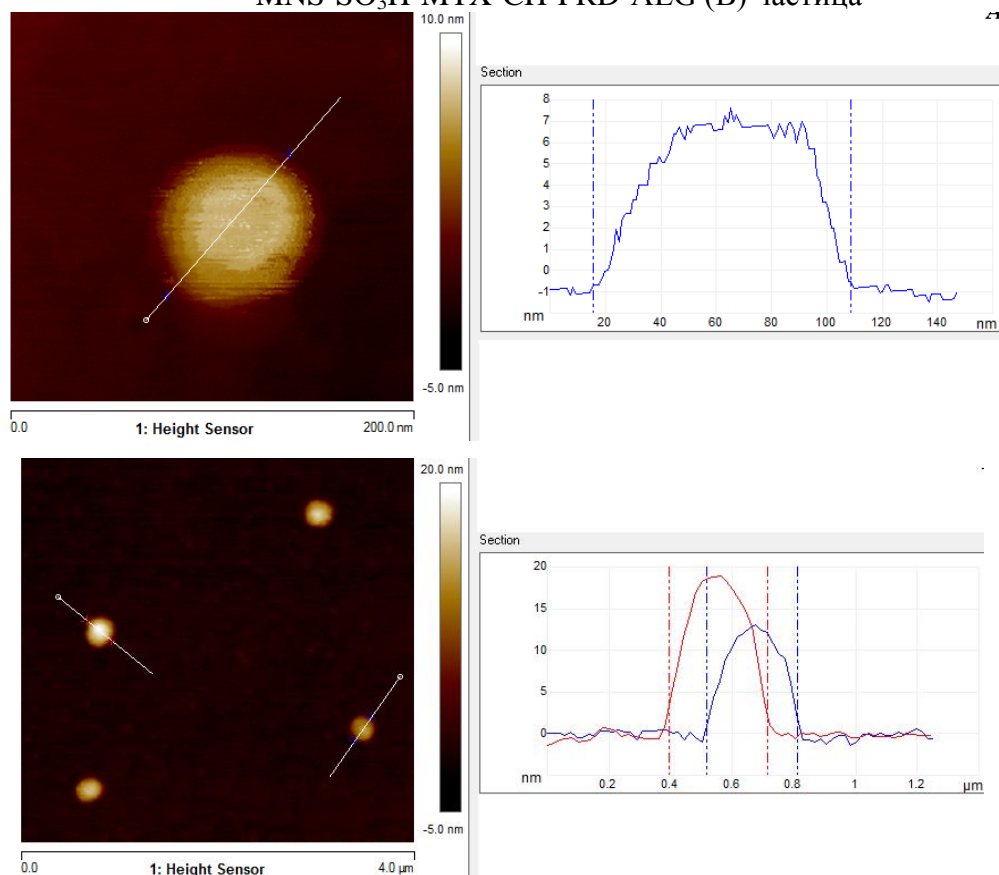
благодарение на полимерното покритие, въпреки че все още се наблюдават някои неравности, които наподобяват мезопорестата структура на частиците.



Фигура 32. AFM изображения на MNS(A) и MNS-SO₃H-MTX-CH-PRD-ALG(B) частици върху стъклена подложка

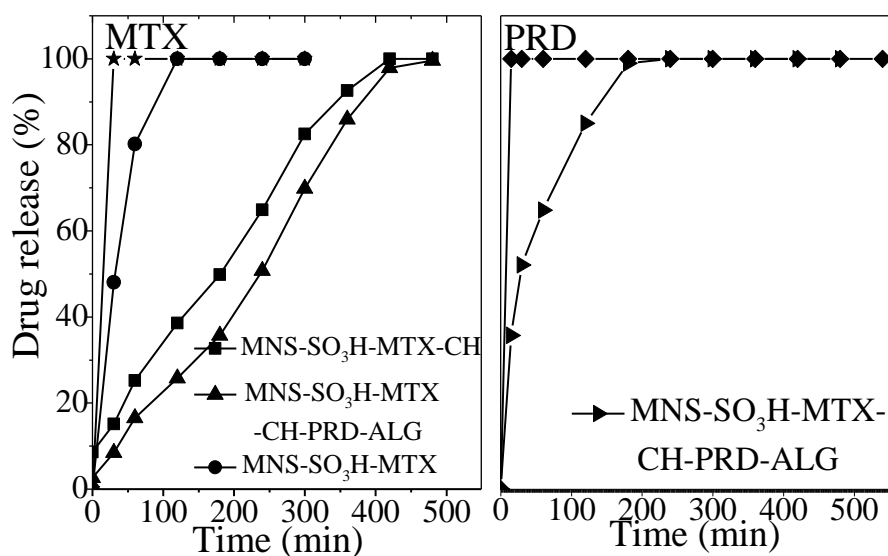


Фигура 33. AFM изображения на единична MNS (A) и MNS-SO₃H-MTX-CH-PRD-ALG (B) частица



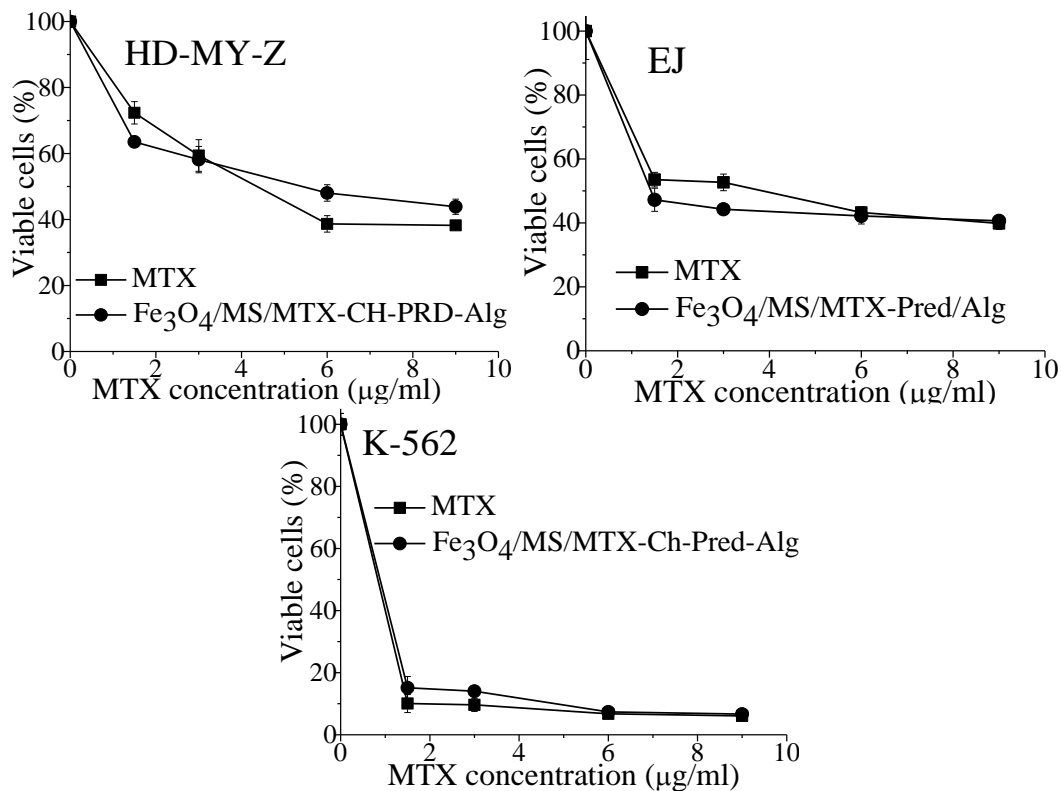
Фигура 34. Напречно сечение на MNS (A) и MNS-SO₃H-MTX-CH-PRD-ALG (B) частиците

Профилът на *in vitro* освобождаването на MTX и PRD от изследваните проби във фосфатен буфер (pH 7.4) при 37°C са представени на Фигура 35. Получените резултати показват, че свободният митоксантрон се разтваря практически веднага при тези условия, което показва, че върху профила на освобождаването му от разработените системи, влияние оказват единствено параметрите на самите носители. Освобождаването на MTX от MNS-SO₃H се характеризира с бързо начално освобождаване, като почти 60 % от него се освобождава в рамките на 30 минути. С оглед оптимизиране на профила на освобождаване на ЛВ от носителите, те са обвити с хитозан. Хитозанът е избран, заради катиония си характер в кисела среда и възможността за образуване на комплекс с отрицателно заредената повърхност на модифицирания материал. Хитозанът е неразтворим при pH=7.4 и полимерният слой около частицата се очаква да забави освобождаването на ЛВ. Както може да се види от получените резултати (Фигура 35), лекарственото вещество се освобождава сравнително бързо от необвитите с хитозан частици, докато при обвитите - пълно освобождаване на ЛВ се постига за 6 часа. Последващото обвиване на системите, съдържащи MTX и PRD с алгинат допринася за допълнително забавяне на освобождаването и на двете натоварени ЛВ.



Фигура 35. *In vitro* освобождаване на митоксантрон и преднизолон при pH=7.4 от функционализираните и обвити с полимери MNS

Цитотоксичните ефекти на свободния и натоварен в силикатните носители митоксантрон са изследвани върху панел от човешки туморни клетъчни линии, след 72 часа третиране (Фигура 36). За целта бяха избрани три различни клетъчни линии - лимфом на Ходжкин (HD-MY-Z), карцином на пикочния мехур (EJ) и хронична миелоидна левкемия (K-562). Свободното и натовареното в композитните материали ЛВ показват силен концентрационно-зависим инхибиращ ефект върху клетъчната пролиферация с изместване на еквивалентните концентрации (IC₅₀) към ниските стойности (Таблица 11).



Фигура 36. Зависимости концентрация-ефект за чистото лекарствено вещество (○), MNS-SO₃H-MXT-CH-PRD-ALG (□) материали срещу клетъчни линии при инкубиране от 72 часа

Таблица 11. Еквиефективните концентрации (IC₅₀) на натоварените с митоксантрон композитни наночастици и чистото лекарствено вещество

Клетъчна линия	IC ₅₀ (µg/ml)	
	MTX	MNS-SO ₃ H-MXT-CH-PRD-ALG
HD-MY-Z	4.4 ± 1.9	5.5 ± 1.8
EJ	3.7 ± 0.5	1.4 ± 0.2
K-562	0.8 ± 0.09	0.87 ± 0.05

Съпоставката на кривите „концентрация-ефект“ ясно показва, че натоварването на MTX в разработените ЛДС не компрометира неговата антинеопластична активност, тъй като кривите на свободен и натоварен MTX практически се припокриват. Тези данни допълнително се потвърждават от изчислените стойности на IC₅₀, които са сравними или идентични при различните клетъчни линии.

ИЗВОДИ

- ❖ Чрез модифициране на условията за синтез са получени сферични наноразмерни MCM-41, SBA-15 и SBA-16 силикати, които са успешно следсинтезно функционализирани с amino групи или цинкови специи. Използваната следсинтезна процедура за получаване на Zn-модифицирани мезопорести силикати позволява чрез вариране на количество на използвания цинков прекурсор да се контролира природата на формираните цинкови специи в порите на носителя.
- ❖ Разработен е нов метод за синтез на сферични нанопорести магнитни желязооксидни/силикатни частици със структура ядро/обвивка, размер около 100 nm, специфична форма и повърхност над 800 m²/g, ядрото на които е изградено от магхемит/магнетит наночастици с размер 11 nm. Определени са условията за следсинтезно функционализиране на получените магнитни нанопорести композитни материали със сулфонови групи.
- ❖ Установени са оптималните условия за ефективно натоварване на противовъзпалителното лекарственото вещество месалазин чрез мокро смилане в кисела среда и неговото предлекарство сулфасалазин чрез импрегниране с омокряне в порите на amino-модифицирани силикати (SBA-16, SBA-15 и MCM-41). Показано е, че натоварването до 33 тегл.% на лекарствените вещества в избраните носители и изграждането на полиелектролитен слой от два полимера (Eudragit S и Eudragit RL) около частиците води до получаване на ефективни доставящи системи с рН-зависими профили на освобождаване на лекарствените вещества.
- ❖ Постигната е висока степен на натоварване (над 40 тегл.%) на кверцетин в порите на изходните и модифицираните мезопорести силикатни материали (MCM-41 и SBA-16) чрез импрегниране с омокряне. За първи път е доказано формирането на стабилен комплекс Zn – кверцетин в мезопорести силикати, което позволява контролирано освобождаване на натовареното вещество при рН=5.5, характерно за изследване на дермални системи.
- ❖ Разработените лекарствени системи, натоварени с кверцетин, проявяват висока селективност срещу клетки на кожен Т-лимфом и са безвредни за здрави епителни клетки, като кверцетинът натоварен в мезопорести материали превъзхожда по отношение на цитотоксична активност чистия кверцетин спрямо злокачествени клетки.
- ❖ Установени са условията за разработване на двукомпонентна доставяща система с противотуморното лекарство митоксантрон и противовъзпалителното вещество преднизолон на основата на модифицирани със сулфонови групи нанопорести магнитни желязооксидни/силикатни наночастици.
- ❖ Показано е, че чрез изграждане на полимерен полиелектролитен слой от хитозан и алгинат около двукомпонентната лекарствена система с митоксантрон и преднизолон може да бъде постигнато оптимизиране на профила на освобождаване на двете лекарствени вещества при запазване на тяхната фармакологичната активност.

ПРИНОСИ

- ❖ Разработени са лекарствени системи с противовъзпалителното лекарствено вещество месалазин и неговото предлекаство сулфасалазин на основата на аминок-модифицирани мезопорести силикатни наноносители със сферична форма като е постигнато рН-зависимо контролирано освобождаване в целевия орган чрез изграждането на полиелектролитен слой от два полимера (Eudragit S и Eudragit RL) около силикатните наночастици.
- ❖ За първи път е доказано формирането на стабилен комплекс Zn – кверцетин в мезопорести силикати. Постигната е висока степен на натоварване (над 40 тегл.%) на кверцетин в изходните и Zn-модифицирани мезопорести силикатни материали и контролирано освобождаване на лекарственото вещество, при което се наблюдава подобрен цитотоксичен ефект в сравнение с чистото вещество, което е доказателство за потенциала на получените носители в дермални доставящи системи на кверцетин за лечение на кожен Т-клетъчен лимфом.
- ❖ Разработена е двукомпонентна система с противотуморното лекарствено вещество митоксантрон и противовъзпалителното вещество преднизолон на основата на модифицирани със сулфонови групи сферични мезопорести магнитни желязооксидни/силикатни наночастици със структура ядро/обвивка, размер около 100 nm и висока специфична повърхност като ядрото е изградено от магхемит/магнетит наночастици с размер 11 nm и са допълнително обвити с полимерен полиелектролитен слой от хитозан и алгинат, осигуряващ контролираното освобождаване и по-високата стабилност на частиците при физиологични условия.

Списък на научните публикации, включени в дисертационния труд

- I. Trendafilova, A. Szegedi, K. Yoncheva, V. Mavrodinova, M. Popova, **Preparation of Mesalazine Delivery Systems Based on Mesoporous Amino-functionalized SBA-16 Silica**, Nanoscience & Nanotechnology 15 No 2 (2015) 36-39
- I. Trendafilova, A. Szegedi, K. Yoncheva, P. Shestakova, J. Mihaly, A. Ristić, S. Konstantinov, M. Popova, **A pH dependent delivery of mesalazine from polymer coated and drug-loaded SBA-16 systems**, European Journal of Pharmaceutical Sciences 81 (2016) 75–81, IF=3.8
- M. Popova, I. Trendafilova, A. Szegedi, J. Mihaly, P. Nemeth, S. Marinova, H. Aleksandrov, G. Vayssilov, **Experimental and theoretical study of quercetin complexes formed on pure silica and Zn-modified mesoporous MCM-41 and SBA-16 materials**, Microporous and Mesoporous Materials 228 (2016) 256-265, IF=3.65
- M. Popova, I. Trendafilova, A. Szegedi, D. Momekova, J. Mihály, G. Momekov, L. Kiss, K. Lázár, N. Koseva, **Novel SO₃H functionalized magnetic nanoporous silica/polymer nanocomposite as a carrier in a dual-drug delivery system for anticancer therapy**, Microporous and Mesoporous Materials 263 (2018) 96-105, IF=3.65
- I. Trendafilova, A. Szegedi, D. Momekova, D. Zgureva, Y. Kalvachev, S. Boycheva, M. Popova, **Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of the prodrug sulfasalazine**, Journal of Drug Delivery Science and Technology 44 (2018) 415-420, IF=2.3

Списък на забелязани цитати по научните трудове, включени в дисертационния труд

I. Trendafilova, M. Popova, A. Szegedi, K. Yoncheva, J. Mihaly, A. Ristić, S. Konstantinov, **A pH dependent delivery of mesalazine from polymer coated and drug-loaded SBA-16 systems**, European Journal of Pharmaceutics, 81 (2016) 75-81.

Цитирана се в:

- A. Abbaszad Rafi, M. Mahkam, S. Davaran, H. Hamishehkar, **A Smart pH-responsive Nano-Carrier as a Drug Delivery System: A hybrid system comprised of mesoporous nanosilica MCM-41 (as a nano-container) & a pH-sensitive polymer (as smart reversible gatekeepers): Preparation, characterization and in vitro release studies of an anti-cancer drug**, European Journal of Pharmaceutical Sciences 93 (2016) 64-73.
- L. Polo, N. Gomez-Cerezo; E. Aznar, J.L. Vivancos, F. Sancenon, D. Arcos, M. Vallet-Regi, R. Martinez-Manez, **Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection**, ACTA BIOMATERIALIA 50 (2017) 114-126.
- E. Mauri, S. Papa, M. Masi, P. Veglianesi, F. Rossi, **Novel functionalization strategies to improve drug delivery from polymers**, Expert Opinion on Drug Delivery 14 (2017) 1305-1313.
- H.-J. Hong, H.S. Jeong, K.-M. Roh, I. Kang, **Preparation of Mesalazine-Clay Composite Encapsulated Alginate (MCA) Bead for Targeted Drug Delivery: Effect of Composite Content and CaCl₂ Concentration**, Macromolecular Research (2018, in press).

M. Popova, I. Trendafilova, A. Szegedi, J. Mihaly, P. Nemeth, S. Marinova, H. Aleksandrov, G. Vayssilov, **Experimental and theoretical study of quercetin complexes formed on pure silica and Zn-modified mesoporous MCM-41 and SBA-16 materials**, Microporous and Mesoporous Materials 228 (2016) 256-265.

Цитирана се в:

- S. Sadjadi, M.M. Heravi, **Current advances in the utility of functionalized SBA mesoporous silica for developing encapsulated nanocatalysts: state of the art**, RSC

ADVANCES 7 (2017) 30815-30838.

- V. Uivarosi, A.- C. Munteanu, Flavonoid Complexes as Promising Anticancer Metallo drugs, Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health, Chapter 14, InTech (2017) 305-333.
- U.T. Uthappa, V. Brahmkhatri, G. Sriram, H.-Y. Jung, J. Yu, N. Kurkuri, T.M. Aminabhavi, T. Altalhi, G.M. Neelgund, M. D. Kurkuri, Nature engineered diatom biosilica as drug delivery systems, Journal of Controlled Release 281 (2018) 70-83.
- W. R. D. N. Sousa, A. R. Oliveira, J. F. Cruz Filho, T. C. M. Dantas, A. G. D. Santos, V. P. S. Caldeira, G. E. Luz Jr, Ciprofloxacin Adsorption on ZnO Supported on SBA-15, Water Air and Soil Pollution 229 (2018) 125-137.

Списък с материали представени на научни научни мероприятия

Постер на международен форум:

- **Ivalina Trendafilova**, Margarita Popova, Ágnes Szegedi, Judith Mihály, Denitsa Momekova, Georgi Momekov, Irina Nikolova, Lyubomir Marinov
“Design of mesoporous Fe₃O₄/MS nanoparticles as drug delivery platform of prednisolone”
International Conference of Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2016, Paris, France
- **Ivalina Trendafilova**, Ágnes Szegedi, Judit Mihály, Margarita Popova
“Study of Quercetin Complexes Formed on Pure Silica and Zn-modified Mesoporous Materials”
International Summer School “Supramolecular Chemistry - Ideas, Design and Methods for investigations” 2016, Borovets, Bulgaria
- **Ivalina Trendafilova**, Margarita Popova
Quercetin Complexes Formed on Initial Silica and Zn-modified Mesoporous Materials
First International Conference on Bio-antioxidants: “Natural Bio-antioxidants – as a base for new synthetic drugs and food additives/supplements”, 2017, Sofia, Bulgaria
- **Ivalina Trendafilova**, Agnes Szegedi, Judit Mihály, Denitsa Momekova, Georgi Momekov, Margarita Popova
Design of Magnetic/Mesoporous Silica Nanocomposites as a Delivery Platform of Antineoplastic Drugs
International Spring School - Supramolecular Chemistry Methods, Concepts and Applications, 2017, Plovdiv, Bulgaria

Постер на национален форум с чуждестранно участие:

- **Ivalina Trendafilova**, Ágnes Szegedi, Krasimira Yoncheva, Vesselina Mavrodinova, Margarita Popova
“Preparation of mesalazine delivery systems based on mesoporous amino-functionalized SBA-16 silica”
16th International Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, NANO 2014, Sofia, Bulgaria

Доклад на международен форум:

- **Ivalina Trendafilova**, Margarita Popova, Agnes Szegedi, Denitsa Momekova, Georgi Momekov
“Mesoporous Silica/Polymer Composites as Carriers in Delivery Systems for Biological Active Molecules”
Summer School in Serbia Medicinal Chemistry – State of Art and Perspectives 2017, Vrnjačka

Banja, Serbia

Доклад на национален форум:

- **Ивалина Трендафилова**, А. Сегеди, П. Шестакова, К. Йончева, М. Попова
„pH зависимо доставяне на месалазин от обвити с полимери мезопорести силикатни системи”
XIV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2015, София, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова
„Изходни и Zn-модифицирани мезопорести материали, като носители на кверцетин“
XV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2016, София, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова, Деница Момекова
„Нови магнетит/мезопорест силикат композитни материали като носители в системи за доставка на противотуморни лекарствени вещества“
XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2017, София, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова, Деница Момекова, Георги Момеков, Нели Косева, Агнес Сегеди
„Нови лекарство-доставящи системи на основата на композитни носители от типа мезопорест силикат-полимер“
8ма научна сесия “Младите учени в света на полимерите”, 2017, София, България

Постер на национален форум

- **I.Trendafilova**, A. Szegedi, K. Yoncheva, P. Shestakova, J. Mihály, A. Ristić, S. Konstantinov, M. Popova
„A pH dependent delivery of mesalazine from polymer coated and drug-loaded SBA-16 systems“
Институт по органична химия с Център по фитохимия, 2015

Доклад на семинар у нас

- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова
“Получаване на лекарство-доставящи системи на основата на функционализирани мезопорести силикати”
IV Научен семинар по физикохимия за млади учени и докторанти, 2015, София, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова
„Разработване на нови модифицирани с металоксидни наночастици мезопорести силикатни системи за контролирано доставяне на кверцетин“
V Научен семинар по физикохимия за млади учени и докторанти, 2016, София, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова, Деница Момекова, Нели Косева, Агнес Сегеди, Георги Момеков
„Обвити с полимерен слой композитни мезопорести материали за целево доставяне на противотуморни лекарствени вещества“
VI Научен семинар по физикохимия за млади учени и докторанти, 2017, Боровец, България
- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова
„Доставящи системи на кверцетин на базата на модифицирани мезопорести силикатни носители“

IX-ти Пролетен семинар на докторантите и младите учени "Интердисциплинарна химия", 2016, Витоша, България

- **Ивалина Трендафилова**, Маргарита Попова
„Изходни и Zn-модифицирани мезопорести материали, като носители на кверцетин“
I-ви Научен семинар за млади учени и докторанти "Нови материали и катализатори за опазване на околната среда" 2016, Копривщица, България

Списък с награди, получени от участия в научни мероприятия

- EXCELLENT POSTER PRESENTATION, 16th International Workshop on Nanoscience And Nanotechnology NANO 2014, София, България
- BEST POSTER PRESENTATION, 2nd Place, First International Conference on Bio-antioxidants, Young Scientists School on Bio-antioxidants 2017, София, България
- НАЙ-ДОБЪР ДОКЛАД, 8^{ма} научна сесия „Младите учени в света на полимерите“ 2017, Институт по полимери, БАН, София, България