

**ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ**  
**НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП**

**Тема: “Доставящи системи за биологично активни вещества с природен произход на базата на иновативни органично-неорганични носители”**

**Участник:** гл. ас. д-р Ивалина Трендафилова

/длъжност/степен, име фамилия/

**Научен ръководител:** проф. д-р Маргарита Попова

/длъжност/степен, име фамилия/

София, 02.2020 год.

***Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)***

През последните десетилетия онкологичните заболявания са водеща причина за смъртността в световен мащаб, което налага необходимостта от все по-интензивни изследвания за подобряване ефективността на лечението им. Приложението на конвенционалните методи за третиране на подобни състояния имат сериозни недостатъци, като: i) неселективност на най-често използваните лекарствени вещества (ЛВ) спрямо туморните клетки, водеща до тежки странични ефекти и увреждане на здрави тъкани и ii) неблагоприятни физикохимични характеристики (ниска водоразтворимост, ниска стабилност при физиологични условия) или фармакокинетични параметри, водещи до нисък терапевтичен потенциал на ЛВ. Съвременна алтернатива за преодоляване на гореописаните недостатъци е натоварването на природни биологично активни вещества с потенциално противотуморно действие в подходящи наноразмерни носители, които да осигурят подобряване на физикохимичните им свойства и поведението им във физиологична среда. Ново и обещаващо направление в развитието на лекарство-доставящите системи (ЛДС) предоставят мезопорестите силикатни материали и композитите на тяхна основа чрез тяхното успешно използване като носители на лекарствени вещества. Уникалните им свойства, като висока специфична повърхност, голям поров обем, възможност за модифициране на морфологията на частиците и повърхността им с различни функционални групи, позволяват постигане на висок капацитет на натоварване и подобряване на разтворимостта на ЛВ и обуславят възможността за целево доставяне до туморните тъкани и контролирано лекарствено освобождаване. Композитите на основа магнитни/силикатни наночастици са перспективни носители при разработване на системи за доставяне на противотуморни вещества, които позволяват селективното доставяне на лекарственото вещество до желан орган или тъкан в тялото, с помощта на външно магнитно поле и едновременното следене на поведението *in vivo* чрез използване на Magentic Resonance Imaging техника.

Основният фокус на настоящият проект е в актуалното интердисциплинарно направление наномедицина, като **главната цел** беше разработване на иновативни системи за тераностика (терапия и диагностика) на заболявания, чрез натоварване на терапевтици с природен произход в наноразмерни мезопорести композитни носители, осигуряващи насочено доставяне и контролирано освобождаване.

**Основни задачи за изпълнението на поставената цел:**

1. Синтез на композити тип магнитни частици/мезопорест силикат с контролиран размер и морфология на частиците и модифициране на повърхността им с органични групи с цел използването им като носители в ЛДС.

2. Оптимизиране процедурите за натоварване на избраните биологично активни вещества (капсаицин, куркумин) в порите на носителите.

3. Изграждане на композитни материали полимер-мезопорест силикат и липид-мезопорест силикат с цел повишаване на биосъвместимостта на получените ЛДС и ефективното доставяне на натоварените вещества.

4. Охарактеризиране на структурните и физикохимичните свойства на получените изходни и модифицирани мезопорести материали и разработените доставящи системи.

5. Биофармацевтично характеризирание на ЛДС в симулирана физиологична среда, характерна за орално и парентерално приложение.

6. *In vitro* оценка на фармакологичните ефекти на получените доставящи системи.

Получаването на нови носители беше осъществено чрез използването, както на методи

базирани на предишни изследвания, модифицирани според конкретните цели, така и чрез нови подходи за получаването на композити позволяващи насочено доставяне и целево освобождаване. За получаването на композитни материали с висока специфична повърхност беше използван зол-гел метод. Повърхността на получените носители за доставящи системи с дермално приложение беше следсинтезно модифицирана със сребро с цел повишаване афинитета на лекарствените молекули към носителя и подобряване на терапевтичната ефективността на доставящите системи. Избраните биологично активни вещества са потенциални терапевтици за редица онкологични заболявания и включването им в подходящи носители и разработването на наноразмерни лекарствени форми може да доведе до повишаване на антитуморната им активност и ще позволи разрешаване на технологични проблеми като ниската им водоразтворимост и стабилност, което би довело до подобряване на ефективността на лечението с тях. За натоварване на лекарствените вещества – капсаицин и куркумин като най-ефективен метод беше избран и използван импрегниране чрез омокране. С цел повишаване биосъвместимостта и стабилността на суспензиите на ЛДС с парентерално приложение около композитните наночастици ще бъде изградена корона от фосфолипиди. Изходните мезопорести нанокомпозити и получените ЛДС бяха охарактеризирани с редица физикохимични методи като прахова рентгенова дифракция, азотна физисорбция, инфрачервена спектроскопия с пълно вътрешно отражение, термогравиметричен анализ, сканираща електронна микроскопия, трансмисионна електронна микроскопия и др. Скоростта и степента на освобождаване на биологично активните вещества (БАВ) от разработените системи бяха проследени при физиологични условия (температура и рН) близки до тези на целевите тъкани. Нанотоксикологичните характеристики на функционализираните носители и цитотоксичната активност на нанесените моделни БАВ ще бъдат проследени чрез подходящи *in vitro* методи (МТТ-тест) върху панел от човешки туморни и немалигнени клетъчни линии.

В допълнение, ще бъдат направени тестове за радикал улавящата способност на чистите и нанесените в разработените доставящи системи БАВ за да се оцени дали нанасянето на тези вещества в получените системи повлиява техните антиоксидантни свойства.

## **Резултати и обсъждане (до 10 стр.)**

### **1. Синтез на мезопорести лекарствени носители**

#### *1.1. Синтез на магнитни наночастици*

Магнитните желязооксидни наночастици бяха получени по солвотермален метод, при който 1.35 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и 3.62 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  се диспергират в 50 ml етилен гликол. Разтворът се прехвърля в автоклав и се нагрява при 200°C за 8 h. Получените магнитни частици бяха изолирани от разтвора посредством магнит и бяха промити трикратно с етанол и вода.

#### *1.2. Синтез на композити тип магнитни частици/мезопорист силикат*

Магнитните композитни материали бяха получени по следната процедура: 180 mg магнитни желязооксидни частици се стриват добре, към тях се прибавя 30 ml дестилирана вода и се оставят за 30 min на ултразвук. След диспергирането на частиците, те се прибавят към предварително приготвен воден разтвор на NaOH (pH~12.5) и 2 g СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide). Получения разтвор се нагрява при 80°C за 2 часа, след което на капки се прибавят 10 ml от източника на силиции – TEOS (tetraethyl orthosilicate). Сместа се оставя при напрекъснато разбъркване и 80°C за още 3 часа. Получената утайка се филтрува под вакуум, промива се трикратно с етанол и вода и се оставя да съхне на стайна температура. За отстраняването на темплейта (СТАВ) беше избрана процедура на екстракция, която се оказва по-подходяща от конвенционално използваната – калциниране. Предимството на екстракцията пред калцинирането е, че дава възможност за получаване на материали с по-големи пори, като в същото време предпазва магнитните частици от окислението им (при високите температури на калциниране) до оксиди непритежаващи магнитни свойства. Екстрахирането на органичния структуроопределящ агент беше извършено в етанол и присъствието на  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  при 80°C за 20 часа. Полученият носител беше означен като MMS (magnetic mesoporous silica).

#### *1.3. Синтез на сферичен SBA-15*

Мезопорестият силикат тип SBA-15 със сферична морфология на частиците беше получен по процедура включваща използването на два структуроопределящи агента – СТАВ и P 123 (Pluronic P-123, триблок съполимер PEO-PPO-PEO). Предварително бяха подготвени отделни разтвори на всеки темплейт, както следва: разтвор 1) – 3 g P123 в 60 ml 1.5M HCl и разтвор 2) – 0.6 g СТАВ в 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Разтвори 1) и 2) се смесват и към тях се прибавят 20 ml етанол и 10 ml TEOS на капки, разбърква се за 45 min при 35°C, след което се прехвърля в автоклави и се третира при 80°C за 48 часа (условията са избрани с цел получаване на сферични частици с висока специфична повърхност и поров обем). Получената бяла утайка е филтрувана на вакуум, промита с  $\text{H}_2\text{O}$  и изсушена на стайна температура. За отстраняване на темплейтите калцинираме при 550°C за 6 часа, със скорост на нагряване 1°C/min. Полученият продукт е означен като sSBA-15 (spherical SBA-15).

#### *1.4. Модифициране на сферичен SBA-15 със сребро чрез йонообмен с темплейта*

Полученият темплей съдържащ сферичен SBA-15 (sSBA-15(T)) беше модифициран с 4 тегл.% (спрямо масата на чистия силикат) сребро по процедура на йонообмен с темплейта. За целта 0.318 g  $\text{AgNO}_3$  бяха разтворени в 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  и към тях бяха прибавени 8.7 g sSBA-15(T) (отговарящи на 5 g калциниран sSBA-15). Разтворът беше оставен при постоянно разбъркване и 80°C за 20 часа. Продуктът е получен след филтруване, промиване с  $\text{H}_2\text{O}$  и кациниране при 550°C за 6 часа, със скорост на нагряване 1°C/min и е означен като AgsSBA-15.

## **2. Натоварване на биологично активни вещества в получените носители**

За натоварване на избраните биологично активни вещества (БАВ) с природен произход в изходните и модифицирани мезопорестите носители беше избран подход на импрегниране с омокрене (incipient wetness impregnation), даващ значително по-добри резултати от метода на нанасяне от разтвор. Методът се състои в разтварянето на БАВ в минимално количество разтворител, след което се прибавя и съответния носител. Следва разбъркване на магнитна бъркалка до пълно изпаряване на разтворителя. При приготвянето на всички доставящи системи беше избрано съотношението носител:БАВ=2:1, което се оказа оптимално за натоварването на БАВ преимуществено в порите на носителите. След проведени експерименти за разтворимост на нанасяните вещества, като най-подходящ разтворител беше избран абсолютен етанол, който освен, че осигурява пълно им разтваряне беше предпочетен също и заради ниската си токсичност. Също така, ниската температура на кипене на абсолютен етанол дава възможност за бързото му изпаряване, дори при стайна температура, което оптимизира времето за получаване на доставящите системи.

### *2.1. Нанасяне на куркумин в MMS:*

С цел получаване на системи за парентерално приложение с целево доставяне на куркумин, последният беше натоварен в MMS по следната процедура: 100 mg куркумин се разтварят в 6 ml етанол и при постоянно разбъркване към него се прибавят 200 ml MMS. Разбърква се до пълното изпаряване на разтворителя. Получената проба е означена като MMS-Curc.

### *2.2. Нанасяне на куркумин и капсаицин в Ag-модифициран и чист sSBA-15:*

С цел получаване на дермални доставящи системи на куркумин (Curc) и капсаицин (Caps), по аналогична на горе описаната процедура бяха получени следните образци: AgsSBA-15-Curc, AgsSBA-15-Caps. За изследване на възможността за синергизъм на двете БАВ бяха приготвени и доставящи системи: AgsSBA-15-CurcCaps и sSBA-15-CurcCaps, като общото количество на БАВ остава същото, както при предходните системи, а куркумина и капсаицина са в съотношение 1:1.

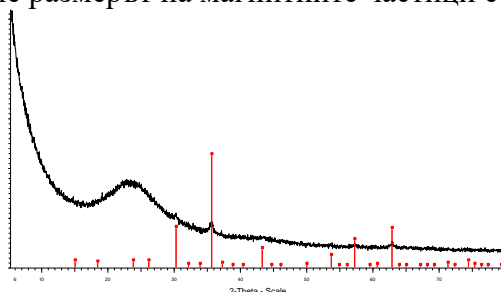
## **3. Изграждане на композитни материали**

За подобряване на биологичната съвместимост и стабилността на разтворите на парентералните доставящи системи за куркумин, получените натоварени мезопорести носители, бяха обвити с фосфолипидни бислоеве от дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и пегилиран дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC-PEG2000). Точно претеглени на аналитична везна проби по 10 mg от предварително натоварените с куркумин MMS наноносители бяха поставени в облодънни колби от 50 ml и към тях са добавени по 1 ml хлороформен разтвор на фосфолипидите DPPC и DPPC-PEG2000 в молни % съотношения 95:5 при тотален липид 10 μmol/ml. След това колбите се поставят в ротационен вакуум изпарител и органичният разтворител се изпарява напълно при 37°C. Полученият тънък филм по стените на колбата се продухва с инертен газ и колбите се поставят във вакуум сушилня за 12 часа за пълно отстраняване на следите от органичен разтворител. След това липидният филм се хидратира според целите на изследването с 1 ml пречистена вода или фосфатен буферен разтвор (pH 7). Хидратирането се осъществява на ротационен вакуум изпарител (при изключен вакуум) при скорост на въртене на колбата 60 rpm. В резултат на хидратирането на фосфолипидните компоненти и дифилния им строеж, те се разполагат на междофазовата граница като формират плътна обвивка около мезопорестите силикатни носители. Наличието на дълговерижни PEG-фрагменти в обвивката осигурява стерично стабилизиране на частиците.

#### 4. Физикохимични свойства на получените изходни и модифицирани мезопорести материали и разработените доставящи системи.

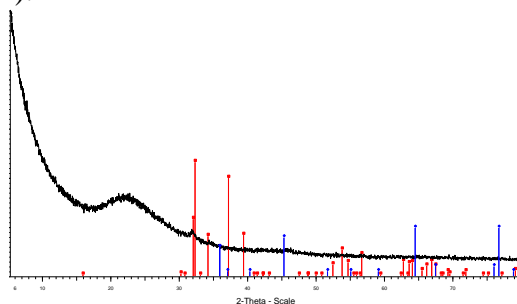
##### 4.1. Рентгенова прахова дифракция (XRD)

Резултатите от направените изследвания с прахова дифракция на желязооксидните/силикатни композити (Фиг. 1) показаха типични рефлексии за  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, т.е. магхемит. При получаването на магнитни наночастици е типично да се наблюдава присъствие, по-скоро на магхемит, отколкото на магнетит, поради склонността на наноразмерният магнетит бързо да се окислява на въздух. И двата желязни оксида притежават магнитни свойства, което е предпоставка за ефективното използване на получените материали, като носители в системи с целево доставяне. От уравнението на Scherrer беше изчислено, че размерът на магнитните частици е около 20 nm.



**Фигура 1. XRD на MMS образците (в червено са обозначени типичните рефлексии за магхемит)**

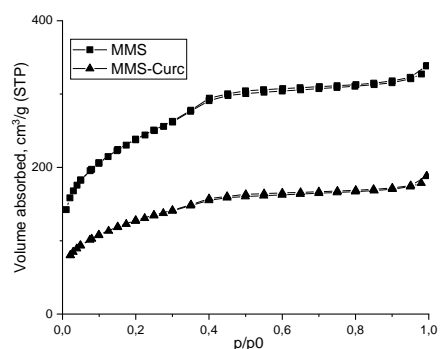
Рентгенограмите на Ag-модифицираните мезопорести силикатни носители (Фиг. 2) показват, че използваната процедура за модифициране чрез йонообмен с темплейта води до получаване на материал с наличие както на сребърен монооксид (AgO), така и на сребърни наночастици с размери около 8-10 nm, което се потвърждава и от направените TEM снимки (виж Фиг. 6 в).



**Фигура 2. XRD на AgsSBA-15 образците (в червено са обозначени типични рефлексии AgO, а в синьо-Ag наночастици)**

##### 4.2. Азотна физисорбция

Изотермите от азотната физисорбция на получените MMS материали са показани на Фиг. 3, а изчислените стойности за специфична повърхност, поров обем и размер на порите са обобщени в Табл. 1. Представените изотермите са от тип IV (IUPAC класификация), което е характерно за мезопорести материали с висока специфична повърхност и тясно разпределение на порите по размер. Изотермите на изследваните материали са с много тесен хистерезис започващ при относителни налягания около  $p/p_0=0.3$ , преминаващ в плато, което е типично за материали с правилни непресичащи се цилиндрични пори, като мезопорест силикат тип MCM-41. След натоварване на куркумина в носителя се наблюдава намаляване на специфичната му повърхност и поровия обем (Табл. 1), което е индикация за запълване на порите.



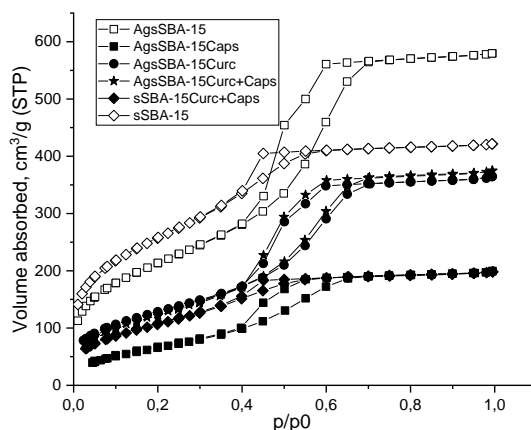
**Фигура 3. N<sub>2</sub> физисорбция на чистите и натоварени с куркумин MMS носители**

**Таблица 1. Текстурални параметри на изследваните образци**

Образец	BET (m <sup>2</sup> /g)	Обем на порите (cc/g)	Поров диаметър <sup>a</sup> (nm)
MMS	820	0.53	3.1
MMS-Curc	444	0.29	3.1

<sup>a</sup> по адсорбция

Изотермите на чистия и сребро-модифициран сферичен SBA-15 са представени на Фиг. 4, а текстуралните параметри са събрани в Табл. 2. В случая отново се наблюдават изотерми от тип IV, но със добре изразен хистерезис и капилярна кондензация при относителни налягания около 0.4. За модифицираните SBA-15 образци хистерезиса е от тип H1, който е типичен за пори с цилиндричната геометрия и тясно разпределение по размер. За изходния калциниран SBA-15 образец се наблюдава несиметричен (триъгълен) хистерезис от тип H2, което говори за свързана порова мрежа и частично блокиране/свиване на входовете на порите. Ефект на свиване на порите и нарушаването на тяхната подреденост е възможен резултат от процедурата на калциниране при високи температури. Този тип изотерми са по-характерни за мезопорест силикат тип SBA-16. При образците с нанесени БАВ се наблюдава намаляване на специфичната повърхност и поровия обем, което предполага ефективното натоварване в порите на носителите.



**Фигура 4. N<sub>2</sub> физисорбция на изходните и натоварени AgsSBA-15 образци**

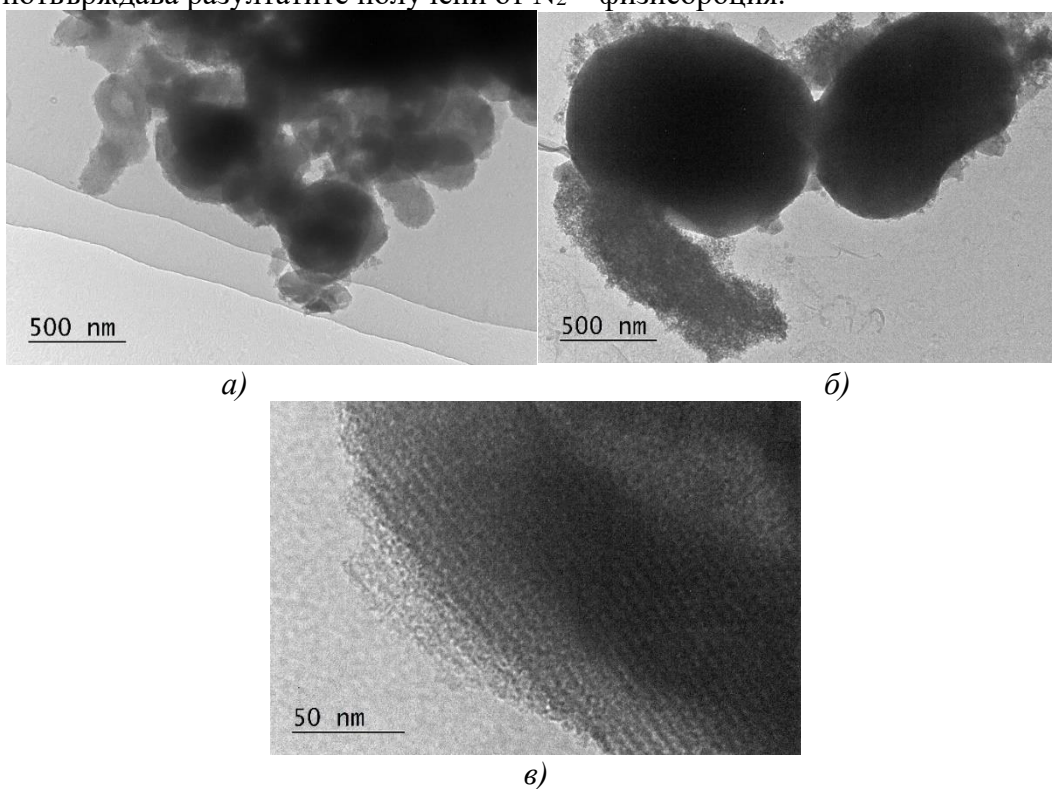
**Таблица 2. Текстурални параметри на изследваните образци**

Образец	BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Обем на порите ( $\text{cc/g}$ )	Поров диаметър <sup>a</sup> (nm)
sSBA-15	904	0.65	3.4
Ag sSBA-15	625	0.75	5
Ag sSBA-15-Curc	447	0.57	4.9
Ag sSBA-15-Caps	258	0.31	4.3
Ag sSBA-15-CurcCaps	460	0.58	4.9
sSBA-15-CurcCaps	397	0.31	3.1

<sup>a</sup> по адсорбция

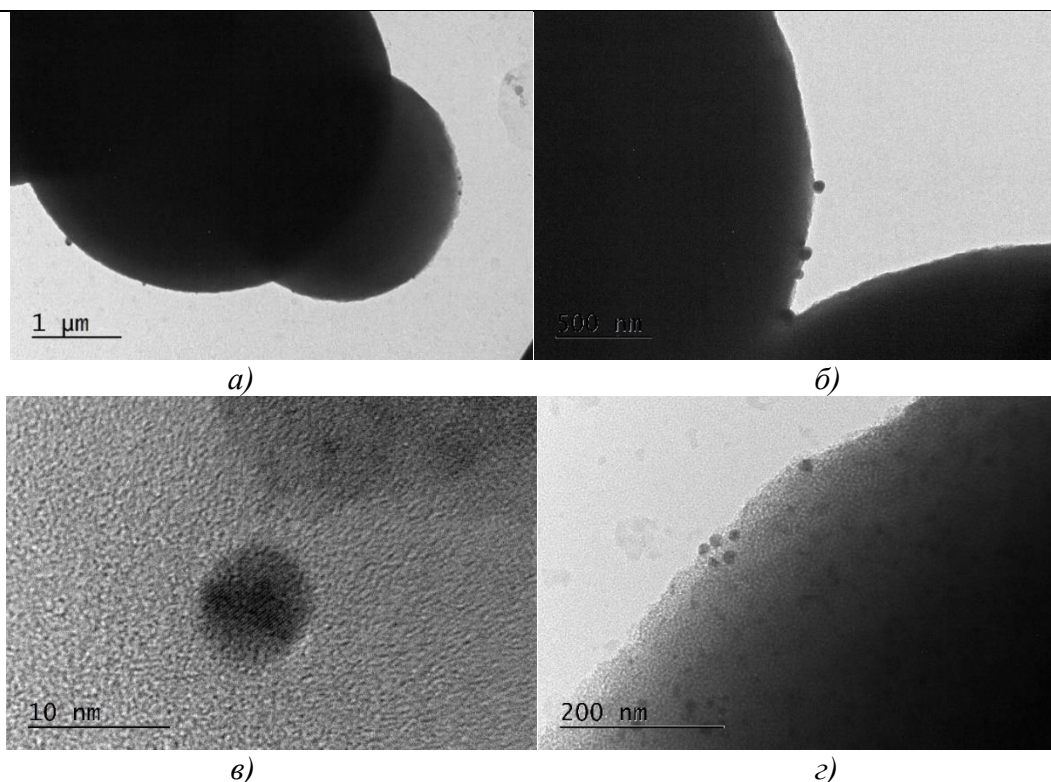
#### 4.3. Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ)

ТЕМ изображенията на MMS образците представени на Фиг. 5, показват получаването на сферични частици с размер около 500 nm (а) и б) и цилиндрична порова структура (в), което потвърждава резултатите получени от  $\text{N}_2$  – физисорбция.



**Фигура 5. ТЕМ изображения на MMS носителите**

ТЕМ изображенията на Ag-модифицирани sSBA-15 носителите представени на Фиг. 6, показват получаването на сферични частици с размер около 1-2  $\mu\text{m}$  (а), които както на повърхността си (б), така и в целия обем (г) съдържат сребърни наночастици с размер около 8 nm (в).



**Фигура 6. TEM изображения на Ag-модифицирани sSBA-15 носителите**

#### 4.4. Термогравиметрия

За да се определи с точност нанесеното количество БАВ в разработените носители беше използван термогравиметричен метод, при който доставящите системи са нагрявани във въздух до 600°C, със скорост на нагряване 1°C/min, в продължение на 60 min. Получените резултати за изследваните проби са представени в Табл. 3.

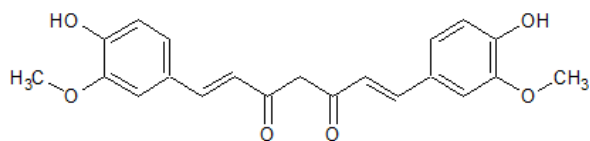
**Таблица 3. Съдържание на БАВ в получените системи**

Образец	Съдържание на БАВ (%)
MMS-Curc	33
AgsSBA-15-Curc	33
AgsSBA-15-Caps	29
AgsSBA-15-CurcCaps	36
sSBA-15-CurcCaps	22

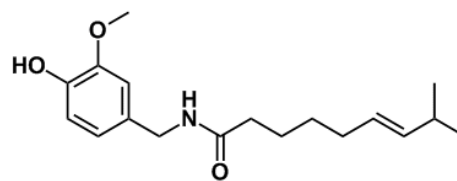
Резултатите показват, че за почти всички проби определеното чрез термогравиметрия количество БАВ съответства (или е много близко) до първоначално заложеното (33%, съотношение 2:1 носител-БАВ), което е индикация за ефективността на нанасяне чрез използвания метод на омокряне. Изключение прави проба sSBA-15-CurcCaps, за която се наблюдава натоварване на по-малко количество (22%) куркумин и капсаицин, което вероятно е резултат от затруднената дифузия на разтвора на веществата в по-тесните входове на пори на този носител.

#### 4.5. Инфрачервена спектроскопия

С цел изясняване на взаимодействието на молекулите на куркумина и капсаицина (Схема 1) с повърхностните функционални групи на модифицираните и изходните мезопорести носители всички натоварени образци са изследвани чрез ATR FT-IR (Фиг. 7).



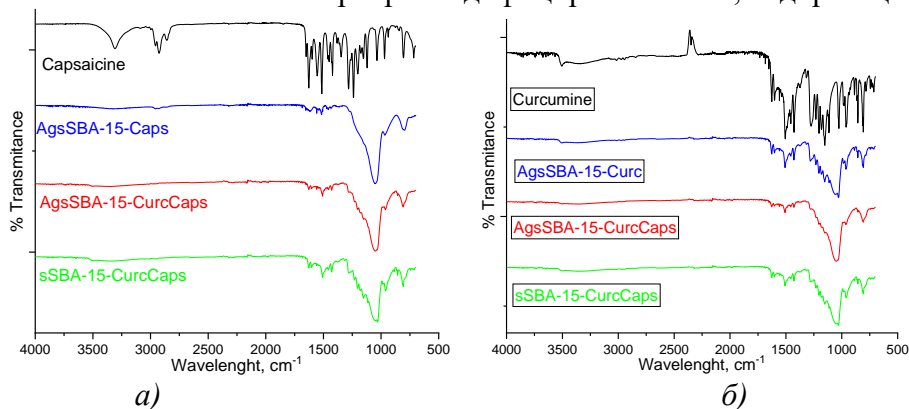
Curcumin



Capsaicin

### Схема 1. Структура на молекулите на куркумин и капсаицин

ИЧ спектърът на чист куркумин съдържа ивица при  $1625\text{ cm}^{-1}$ , приписвана на припокриващите се сигнали за валентни трептения на алкени ( $\text{C}=\text{C}$ ) и карбонилна група ( $\text{C}=\text{O}$ ). Спектърът на куркумин се характеризира и с плато при  $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ , дължащо се на присъствието на  $\text{O}-\text{H}$  групи и образуването на водородни връзки, ароматни  $\text{C}=\text{C}$  валентни трептения при  $1427\text{ cm}^{-1}$  и високоинтензивна ивица при  $1506\text{ cm}^{-1}$  за смесени трептения включително валентни на карбонилната връзка  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , равнинни валентни около алифатните  $\delta\text{ CC-C}$ ,  $\delta\text{ CC}=\text{O}$  и равнинни деформационни за ароматни  $\delta\text{ CC-H}$  и валентни трептения около ароматните  $\nu\text{CC}$  връзки. Освен това, се наблюдава относително интензивна ивица при  $1274\text{ cm}^{-1}$ , която е приписана на деформационните трептения на  $\nu(\text{C}-\text{O})$  на фенолната група. Спектрите на куркумин нанесен в мезопорести носители показва, намаляване на интензитета на ивицата при  $1506\text{ cm}^{-1}$ , която може да бъде приписана на валентни трептения на карбонилната група  $\nu(\text{C}=\text{O})$ . Този ефект е най-силно изразен при системата на базата на сребро-модифициран носител, съдържаща двете БАВ.



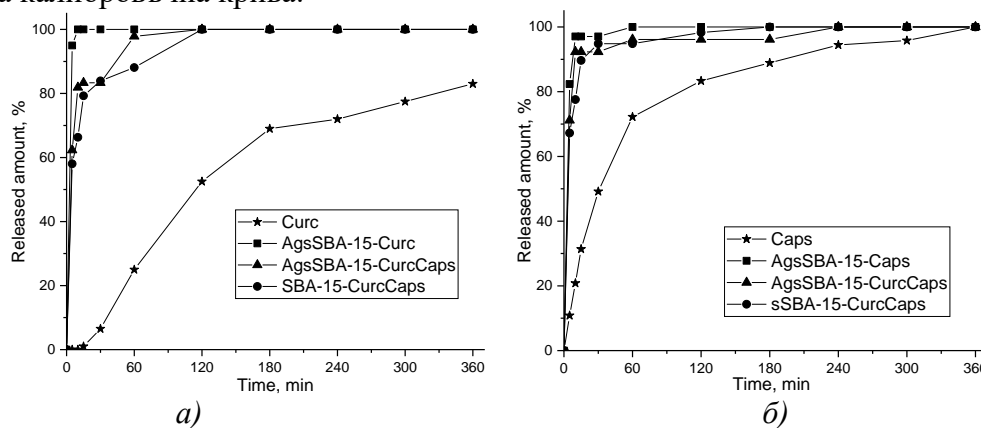
Фигура 7. ATR FTIR спектри на чисти и натоварени в sSBA-15 носители куркумин (а) и капсаицин (б)

Характеристичните пикове, които се наблюдават за чистия капсаицин се дължат на:  $\text{N}-\text{H}$  валентни ( $3307\text{ cm}^{-1}$ ), алифатни  $\text{C}-\text{H}$  валентни. ( $2926\text{ cm}^{-1}$ ,  $2858\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}=\text{O}$  валентни ( $1626\text{ cm}^{-1}$ ), ароматни  $\text{C}-\text{C}$  валентни ( $1555\text{ cm}^{-1}$ ) и извънравнинни  $\text{C}-\text{H}$  деформационни ( $806\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{N}-\text{H}$  деформационни и  $\text{C}-\text{N}$  валентни (Amide II) ( $1514\text{ cm}^{-1}$ ), асиметрични  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  валентни ( $1282\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}-\text{O}$  валентни ( $1201\text{ cm}^{-1}$ ) трептения. За капсаицина, нанесен в разработените носители се вижда намаляване и почти изчезване на извиците за  $\text{N}-\text{H}$  и  $\text{C}=\text{O}$  валентните трептения, което е индикация, че тези групи от молекулите на капсаицина взаимодействат най-силно с функционалните групи от повърхността на носителите.

## 5. Биофармацевтично характеризиране на доставящите системи в симулирана физиологична среда

### 5.1. Освобождаване на куркумин и капсаицин при pH=5.5

*In vitro* освобождаването на куркумин и капсаицин от получените доставящи системи беше изследвано във фосфатни буфери с pH=5.5, типично дермални формулировки (Фиг. 8). При физиологични условия (37°C) в 100 ml буфер се поставят 5 mg от доставящите системи или 2 mg чисто вещество, като на определени интервали от време се взема аликвота от 3 ml, която след измерване на абсорбцията (при 427 nm за куркумин и 280 nm за капсаицин) се връща в разтвора с цел избягване на грешка при намаляване на обема на акцепторната фаза. Освободеното количество БАВ се определя по предварително изготвена калибровъчна крива.



**Фигура 8. Профил на освобождаване на куркумин (а) и капсаицин (б) от получените носители**

За доставящите системи на куркуин и капсаицин се наблюдава подобряване на разтворимостта на БАВ в буфер pH=5.5, като за изследвания период (6 часа) най-силно изразен ефект (освобождаване на 100% до 15 min) се наблюдава за системите на базата на модифицирания със сребро силикатен носител натоварен само с едно от веществата. За чистия носител натоварен с двете БАВ се наблюдава първоначално забавяне на освобождаването (до 120 min), което вероятно се дължи на тесния вход на порите, което възпрепятства дифузията на БАВ от порите в акцепторната среда.

### 5.2. Определяне на радикалулваща способност (RSA) на чисти и натоварени в силикатните носители БАВ

С цел да се определи дали тези вещества запазват радикалулващата си способност след нанасянето им в получените мезопорести композитни носители бяха проведени изследвания за инхибиране на 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) свободни радикали. DPPH радикалът, притежаващ свободен електрон, се характеризира с интензивен виолетов цвят и абсорбция при  $\lambda = 517$  nm. При приемането на електрон от вещество с антиоксидантни свойства се наблюдава обезцветяване на разтворите на този радикал, което лесно може да бъде количествено определено от промяната в абсорбцията. RSA се изразява като процент на инхибиране по отношение на контролна стойност. Капсаицин, куркумин и смес от двете вещества са използвани като положителна контрола (с концентрации съответно 200  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  и 200  $\mu\text{g/ml}$ ). RSA на пробите е изчислена по уравнението:  $\text{RSA}(\%) = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$ , където  $A_0$  е абсорбцията на контролната проба, а  $A_s$  е абсорбцията на тестваната проба. Резултатите от направените изследвания са обобщени в Табл. 4.

**Таблица 4. RSA на чистите БАВ и получените системи**

Образец	DPPH RSA (%)
Curcumin	30,10 ± 1,50
Capsaicin	13,03 ± 0,77
Curcumin + Capsaicin	35,87 ± 0,62
AgsSBA-15-Curc	31,58 ± 1,61
AgsSBA-15-Caps	13,93 ± 0,23
AgsSBA-15-CurcCaps	28,65 ± 1,20
sSBA-15-CurcCaps	37,11 ± 1,32

За всички изследвани доставящи системи се наблюдава близка, дори повишена радикал улавяща способност на нанесените вещества в сравнение с чистите. Това вероятно се дължи на подобряването на разтворимостта на БАВ след нанасянето им в порите на разработените носители.

#### **6. *In vitro* оценка на фармакологичните ефекти на получените доставящи системи**

Задължително изискване за всички материали, използвани с биологично приложение е липсата на токсичност. Цитотоксичният потенциал на мезопорестите силикати и получените доставящи системи ще бъде определен при човешки клетки с различен произход:

- за системите с парентерално приложение: доброкачествени епителни НЕК-293, злокачествени EJ (рак на пикочен мехур) и HL-60 (остра промиелоцитна левкемия).
- за дермалните доставящи системи: доброкачествени епителни НЕК-293 и злокачествени HUT-78 (Т-клетъчен лимфом)

Клетъчни линии бяха избрани с цел да се направи сравнение между инхибиращия потенциал на получените от нас системи и свободното БАВ.

##### **6.1. Метод на клетъчно култивиране**

Всички дейности, свързани с култивирането, се осъществяват при спазване на изискванията за стерилност на използваните инструменти, материали и разтвори. Основните процедури по третиране на клетките се извършват в ламинарен бокс.

Клетките са рутинно култивирани при стандартни условия в култивационни матракчета в инкубатор при 37°C и максимално овлажнена атмосфера, съдържаща 5% CO<sub>2</sub>. Трансформираните клетъчни линии се култивират в хранителна среда RPMI 1640, обогатена с 2 mM L-глутамин и 10% фетален телешки серум. На всеки 2-3 дни от матраците се остраняват около 2/3 от обема на клетъчната суспензия и се добавя нова среда за култивиране, в количество равно на отстраненото. Целта е да се поддържа логаритмичната фаза на растеж на клетъчната линия.

##### **6.2. Определяне на цитотоксичност на ненатоварени и натоварени с куркумин наноразмерни носители**

Преживяемостта на клетките ще бъде оценена чрез използване на МТТ-метод, който се основава на способността на жизнеспособни клетки да метаболизират, под действие на митохондриалния ензим сукцинат-дехидрогеназа, жълтата тетразолиева сол до неразтворим виолетов формазанов продукт, който е спектроскопски детектеруем при 527 nm. Експоненциално пролифериращи клетки се култивират в стерилни плоскодонни 96-ямкови микроплаки при гъстота от 1×10<sup>4</sup> клетки/ямка като във всяка ямка се съдържат 100 µl от средата. Плаките се инкубират в продължение на 24 часа, за да се адаптират клетките или за да адхезират към дъното на плаките, в случаите на културите растящи като монослой. След това водни дисперсии на чистите БАВ и носителите, както и изследваните системи на базата на мезопорестите силикати се прибавят в различни

концентрации към клетките, като за всяка изследвана концентрация ще бъдат използвани 6 отделни ямки и плаките се инкубират при 37°C в продължение на 72 ч. След изтичане това към всяка ямка се прибавят 10  $\mu\text{L}$  аликвоти от 5 mg/ml разтвор на МТТ във фосфатен буфер и плаките се инкубират за още 4 часа при 37°C. За да се разтворят образуваните формазанови кристали към всяка ямка се прибавят 110  $\mu\text{L}$  5% разтвор на  $\text{HCOOH}$  в 2-пропанол. Абсорбцията на МТТ-формазана е определена спектрофотометрично. Резултатите ще бъдат нормализирани като процент от нетретираната контрола (100%). За да бъдат изчислени  $\text{IC}_{50}$  стойностите (концентрациите при които виталността на клетките намалява на половина) МТТ-данните ще бъдат фитирани към сигмоидални криви “концентрация-ефект” чрез нелинейна регресия.

***Експериментите за определяне на цитотоксичността на изходните и натоварени с куркумин и капсаицин мезопорести силикатни носители са в процес на изработване. Отлагането на провеждането на експериментите беше наложено поради напредвидената ситуация около затварянето на учебни заведения и лаборатории на наши партньори, поради епидемиологичната обстановка в страната.***

По време на настоящия проект, докълнително бяха разработени Mg-съдържащи мезопорести силикати като носители на природния полифенол кемферол. За целта бяха получени мезопорести силикати тип MCM-41, модифицирани с магнезии чрез различни *in situ* (директен синтез – DS) и следсинтезни техники (импрегниране с омокряне – IWI и йонообмен с темплейта – TIE). Голям набор от методи за характеризиране ( $\text{N}_2$ -физисорбция, XRD, EDX и др.) бяха използвани за определяне влиянието на процедурата на модифициране върху физикохимичните свойства и химичния състав на получените носители. Резултатите от направените EDX изследвания показаха, че при метода на директен синтез се получава материал с най-високо съдържание на модифициращия агент (магнезии). Методът на йонообмен с темплейта води до получаване на Mg-модифициран силикат с по-големи пори, в сравнение с материалите получени чрез DS или IWI. Кемферолът, полифенол с антиоксидантна активност и множество доказани благоприятни ефекти върху човешкото здраве, беше ефективно натоварен в получените изходни и Mg-съдържащи носители чрез процедура на импрегниране с омокряне. Взаимодействието на молекулите на полифенола с повърхността на носителите беше изследвано чрез ИЧ спектроскопия. Данните показаха най-силно взаимодействие на молекулите на кемферола с носителя получен чрез директен синтез, което може да бъде обяснено с наличието на по-голямо количество магнезий в пробата и възможността за образуване на комплекс магнезий-кемферол. Освобождаването на кемферол беше изследвано във фосфатни буфери характерни за доставящи системи с орално приложение (pH 1.2 и 6.8), като резултатите показаха подобрена разтворимост на нанесения в мезопорестите силикати полифенол, в сравнение с чистото вещество. Оценката на радикалуващата способност на кемферола показва, че нанасянето му в изходни и следсинтезни Mg-модифицирани силикатни носители не повлиява неговата активност спрямо DPPH радикали. От друга страна, системата на базата на Mg-съдържащ силикат получен чрез директен синтез, показва почти двойно намаляване на неговата радикалуващата способност, което може да е ефект от формирането на силен комплекс магнезий-кемферол. Подробно всички методи и резултати са описани в изготвената научна публикация (виж „Публикации...“).

### **Изводи/Обобщение**

- Успешно бяха синтезирани желязооксидни/силикатни композити с цел използването им като носители в системи с паренретадно приложение за целево доставяне на куркумин. Получените материали се характеризират с висока специфична повърхност и голям поров обем, позволяващи нанасяне на значително количество БАВ.
- Чрез импрегниране с омокрене беше постигната висока степен на натоварване на куркумин (33%) в порите на носителя. Получените натоварени композитни носители бяха ефективно обвити с бислои от фосфолипиди.
- За изготвянето на дермални доставящи системи с капсаицин беше разработен метод за получаване на сребро-модифицирани силикатни носители чрез използването на два структуроопределящи агента. Было доказано, че използването на процедура на модифициране чрез йонообмен с темплейта води до получаването на материал с по-големи пори, в сравнение с материала, получен чрез калциниране. Всички материали се характеризират със сферична форма на частиците, висока специфична повърхност и поров обем.
- Установени бяха условията за получаване на ефективни доставящи системи, с потенциално дермално приложение, за куркумин и капсаицин на базата на модифицираните с Ag, мезопорести силикатни носители. Постигната беше висока степен на натоварване на изследваните БАВ (до 33 %) в модифицирани мезопорести силикатни носители.
- *In vitro* профилите на освобождаване на натоварените БАВ при физиологични условия, подходящи за дермални доставящи системи, показаха подобрена разтворимост на нанесените вещества в сравнение с чистите.
- Анализът на инхибиращата активност спрямо DPPH свободни радикали, показва, че нанасянето на БАВ в порестите носители не компрометира, дори в някои случаи, благоприятства радикал улавящата способност на куркумина и капсаицина.
- От получените резултати може да се заключи, че разработените композитни мезопорести материали са подходящи, като носители в доставящи системи на БАВ с природен произход.

**Публикации (излезли или подадени за печат публикации, в които изрично е изказана благодарност към Програмата) и участия на научни форуми**

Публикации:

- **Physicochemical and pharmaceutical properties of kempferol based on the Mg-containing MCM-41 mesoporous silicas** – изпратена за рецензия в списание *Materials Today Communications* (IF=2.67)

Резултатите за доставящите системи на куркумин и капсаицин са в процес на обобщаване и интерпретация, след което се предвижда да бъдат публикувани в две статии (магнитни мезопорест силикат-липиди композити за парентерална доставка на куркумин и дермални системи на базата на Ag-модифицирани мезопорести силикати за доставяне на куркумин и капсаицин) в реферирани международни списания.

Научни форуми на които са представени резултатите:


- И. Трендафилова, Р. Чимширова, Х. Лазарова, Н. Косева, М. Попова, **Mg-Съдържащи мезопорести силикатни наночастици за доставка на противотуморни вещества с природен произход**, Юбилейна научна сесия посветена на 100-годишнината от рождението на академик Георги Близнаков, 18.11.2020, София

Кариерно развитие:

- Получените в рамките на проекта резултати и усвоени техники за синтез, анализ и интерпретиране на данни помогнаха за кариерното и академичното ми израстване. В периода на настоящия проект участвах в конкурс за заемане на академична длъжност „Главен асистент“ по професионално направление „Химически науки“ – 4.2, научна специалност „Органична химия“ в лаборатория ОРММ към ИОХЦФ-БАН и след успешното ми представяне бях назначена на съответната длъжност (20.05.2020 год.).

Дата:04.02.2020

Изготвил:



/Ивалина Трендафилова/

Научен консултант:



/проф. д-р Маргарита Попова/