



Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Физико-технологичен факултет

Катедра „Физика“

София Боянова Миленкова

**Биополимерни микро- и наночастици като система за доставка на
бензидамин**

Автореферат

На дисертационен труд

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

*по област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика,*

професионално направление 4.1. Физически науки

докторска програма „Физика на кондензираната материя“

Научни ръководители: проф д-р Мария Марудова-Живанович

и доц. д-р Бисера Пиличева

ПЛОВДИВ, 2024 г.

Дисертационният труд съдържа 159 страници, в които са представени 46 фигури и 13 таблици. Използвани са 162 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в Катедра „Физика“ към Физико-технологичен факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Експерименталните изследвания, свързани с дисертационния труд, са проведени в катедра по „Физика“ към Физико-технологичен факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, в лабораториите на Център по технологии към ПУ „Паисий Хилендарски“, в катедра по Фармацевтични науки към Фармацевтичен факултет на МУ-Пловдив и в лабораториите към Катедра „Фармацевтични технологии“ към Университета в Сегед, Унгария.

Във връзка с настоящия дисертационен труд са публикувани 3 научни статии в индексирани издания. Резултатите са представени на 5 международни научни форума.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Физика“ към Физико-технологичен факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 8.06.2024 г. Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 27.09.2024г. от 13 ч. в зала „Компас“ на ПУ „П. Хилендарски“ пред жури в състав:

Доц. д-р Ася Петрова Виранева
Проф. д-р Кръстена Тодорова Николова
Проф. д-р Пламен Иванов Загорчев
Доц. д-р Пламен Димитров Кацаров
Доц. д-р Стефка Николова Касърва

Резервни членове:

доц. д-р Иванка Йорданова Влаева - външен
доц. д-р Гинка Калчева Екснер - вътрешен

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

	СЪДЪРЖАНИЕ	
I.	УВОД	4
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	5
III.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	
3.1.	<u>Материали</u>	6
3.2.	<u>Методи за получаване на микро- и наноразмерни частици</u>	6
3.3.	<u>Методи за характеризиране на полимерните структури</u>	7
IV.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	10
V.	ИЗВОДИ	30
VI.	ПРИНОСИ	31
VII.	ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	31
VIII.	ПРИЛОЖЕНИЯ	31

Използвани съкращения и означения

АСМ – атомно-силова микроскопия

БАВ – биологично активно вещество

ДЛС – dynamic light scattering, динамично светоразсейване

ДСК – диференциално сканираща калориметрия

ЕВ – ефективност на включване

ПЕ – полиелектролити

ПЕК – полиелектролитни комплекси

СЕМ – сканираща електронна микроскопия

ТЕМ – трансмисионна електронна микроскопия

ФТИР – Фурие-трансформирана инфрачервена спектроскопия

Хит. И Chit – хитозан

ВНСI – бензидамин хидрохлорид

Cas – казеин

NaTRP – натриев триполифосфат

ЕВ – ефективност на включване

I. УВОД

Полимерите се доказват все по-успешно като база за разработване на ново поколение материали и композити, благодарение на високата им функционалност и разнообразие на структурата и свойствата им. В основата на това засилено внимание е фактът, че те могат да формират структури с различна архитектурата и морфология посредством голям набор от методи за получаване. Особено внимание привличат-биополимерите, отличаващи се с биосъвместимост, биоразградимост, неимуногенност и липса на токсичност.

Осезаемо е влиянието на полимерните микро- и наноразмерните частици в областта на фармацията при получаването на лекарстводоставящи системи. Този тип структури позволяват индивидуален подход, съобразен с нуждите на съответната терапия и избраното активно вещество. Поради значително по-малкия си размер и високата си биотолерантност, тези структури могат да преминават през различни биологични мембрани (напр. кръвномозъчната) или да доставят лекарството вътре в самите клетки. Повърхностното им функционализиране позволява специфично взаимодействие с рецептори или определен тип клетки, което осигурява доставка на активно вещество в определена цел (т.нар. таргетна или целева доставка). В случаите на лекарстводоставяне чрез полимерна матрица, се увеличават значително възможните пътища на въвеждане, като съществено значимо е локалното приложение на терапевтичната система. В допълнение, тези структури позволяват модулиране на профила на освобождаване, осигурявайки по-висока терапевтична ефективност и удължена циркулация на активното вещество, едновременно с потенциално съкращаване на необходимия брой приеми и време на лечение.

Въпреки наличието на вече съществуващи лекарстводоставящи системи, разработването на полимерна структура с висок коефициент на включване и добив, както и подходящ профил на освобождаване за водоразтворими лекарства, се оказва предизвикателство. Поради високата си разтворимост, активните вещества бързо мигрират обратно във водната среда или се освобождават в рамките на няколко минути, непозволявайки удължено освобождаване. Създаването на частици на базата на биополимери с различен биологичен произход (напр. полизахарид и полипептид), както и голямото разнообразие от методи за получаване на структури, дават възможност за разнообразни комбинации и подходи към този проблем. В допълнение, самите структури трябва да притежават подходящ размер, съобразен с мястото на потенциално приложение, морфология и физико-химични свойства и характеристики.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

След направената литературна справка и систематизиране на публикациите, разглеждащи структури на база хитозан и/или казеин, не бяха намерени достатъчно подробни изследвания относно потенциала им като система за доставка на бензидамин хидрохлорид с контролирано освобождаване.

Затова основната цел на настоящия труд е да се разработят микро- и наноразмерни структури на базата на биоразградими и биосъвместими полимери, които да послужат като лекарстводоставяща матрица за контролирано освобождаване на лекарственото вещество бензидамин хидрохлорид.

За да се постигне тази цел, са формулирани следните задачи за изпълнение:

- 1) Разработване и охарактеризиране на натоварени с бензидамин хидрохлорид наночастици от хитозан, които са получени чрез йонотропно желиране при вариране на концентрацията на полимера и омрежителя.
- 2) Разработване и охарактеризиране на натоварени с бензидамин хидрохлорид микрочастици от казеин, които са получени чрез йонотропно желиране в кисело рН при вариране на концентрацията на полимера и омрежителя.
- 3) Получаване и охарактеризиране на натоварен с бензидамин хидрохлорид полиелектролитен комплекс на казеин/хитозан при различни отношения на комплексобразуващите полимери.
- 4) Получаване и изследване на частици от хитозан (празни и натоварени с бензидамин хидрохлорид) чрез разпрашително сушене в присъствие на омрежител и ексципиент.
- 5) Получаване и изследване на натоварени с бензидамин хидрохлорид наочастици от казеин, получени чрез разпрашително сушене при вариране на отношението полимер/лекарство.
- 6) *In vitro* изследване на профила на освобождаване на лекарственото вещество бензидамин хидрохлорид от разработените микро и наноразмерни структури.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

В настоящата работа са използвани следните реагенти: нискомолекулен хитозан (Glenthams life sciences, Великобритания), натриева сол на казеин, добита от краве мляко (Sigma Aldrich, Германия), калциев дихлорид дихидрат (Валерус, България), натриев триполифосфат (Sigma Aldrich, Германия), Бензидамин хидрохлорид (Sigma Aldrich, Германия).

3.2. Методи за получаване на микро- и наноразмерни частици

3.2.1. Йонотропно омрежени частици от хитозан с натриев триполифосфат

Използван е разтвор на хитозан с концентрации 0,1%, 0,2% и 0,3% в 2% оцетна киселина. В обема на полимерния разтвор се накапва при постоянно разбъркване 5% разтвор на натриев триполифосфат (NaTPP) до достигане на масови отношения полимер:омрежител съответно 3:1, 5:1 и 7:1. Сместа се разбърква на магнитна бъркалка при 1 500 rpm за 2 h при температура 25 °C. Гелните частици се отделят от реакционната смес чрез центрофугиране за 30 min и за 15 min след промиване с вода при 15 000 rpm. Получените структури се лиофилизират за 72 h при 10 Pa налягане и температура от -50 °C, след което се съхраняват в ексикатор при RH 20%. За синтез на натоварени частици, лекарството се добавя към разтвора на хитозан и хомогенизира за 30 min на магнитна бъркалка.

3.2.2. Йонотропно омрежени частици от казеин с натриев триполифосфат

За формирането на тези частици е използван разтвор на казеин (1% или 2%) в силно подкислена вода (pH = 3). Към определен обем от полимерния разтвор при постоянно разбъркване се накапва натриев триполифосфат в масово отношение 1:3, 1:5 и 1:10 в полза на полимера. Разтворът се разбърква за 2 h на магнитна бъркалка при 1 500 rpm и при температура 25 °C. Колоидните частици се отделят посредством центрофугиране на 14 000 rpm за 15 min, изплакване с дестилирана вода и повторно центрофугиране при същите обороти, но за 10 min. Получените структури се лиофилизират за 72 h и се съхраняват в ексикатор при RH 20%. За системите, натоварени с лекарство, лекарството се добавя към разтвора на казеин 30 min преди омрежването.

3.2.3. Йонотропно получен полиелектролитен комплекс между хитозан и казеин

Използвани са 0,5% полимерни разтвори. Хитозанът е разтворен в 3% оцетна киселина, а казеинът – в дестилирана вода. Непосредствено преди тяхното смесване, pH на разтвора от хитозан се повишава до 5, а това на казеина остава непроменено (pH ≈ 7). Получени са 5 типа частици на базата на различни моларни отношения между активните групи на комплексообразуващите полиелектролити – 5:1, 3:1, 1:1, 1:3 и 1:5 (хитозан:казеин) при pH = 6. Така получената колоидна система се оставя да

се разбърква 15 min на 1 500 rpm на магнитна бъркалка, след което се соничира в ледена баня (UP100H Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) за още 20 min при максимална амплитуда и коефициент на запълване 80%. Гелните частици се центрофугират за 15 минути при 14 000 rpm и лиофилизират при налягане 10 Pa и температура $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 72 h. Съхраняват се в ексикатор при RH 20% При получаване на частици с включен VHSI, лекарството се добавя към разтвора на хитозана 30 min преди смесването с казеина.

3.2.4. Частици от хитозан, получени с Büchi Mini Spray dryer (B-191)

Подготвен е разтвор на хитозан с различни концентрации (0,1%, 0,2% и 0,3%) в 2% оцетна киселина. Получени са три типа частици: частици от хитозан (неомрежени), частици от хитозан, омрежени с натриев триполифосфат и частици от хитозан с манитол, добавен като помощно вещество (ексципиент). Първият тип частици са разпрасени от разтвори с различни концентрации. За разработването на омрежени частици е фиксирана една концентрация на хитозана 0,2% и са ползвани 3 различни концентрации на натриевия триполифосфат (0,05%, 0,1% и 0,5%). Системите, съдържащи манитол, са разработени с 0,2% разтвор на хитозан, като са постигнати три масови отношения помежду им – 1:5, 1:7.5 и 1:10 в полза на манитола. Лекарството се добавя 30 min преди процеса на омрежване или разпрасяване в масово отношение с хитозана 1:2 в излишък на полимера.

3.2.5. Частици от казеин, получени с Büchi Nano Spray dryer (B-90 NP)

За подготовката на тези частици е използван 1% разтвор на казеин в силно подкислена вода до pH=2. Омрежването е реализирано с 1 M разтвор на калциев дихлорид, с концентрация 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Така получения разтвор се хомогенизира за 15 min при 25 000 rpm, разбърква на магнитна бъркалка за 30 min при 500 rpm. След това разтворите са разпрасени при следните условия: размер на мрежичката – 4 μm , входна температура – $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, скорост на изпомпване на разтвора – 50 %, интензивност на разпръскване – 70% и дебит на изсушаващия газ – 120 L/min. Постигнати са масови отношения полимер:лекарство 1:1, 2:1, 4:1, 6:1.

3.3. Методи за характеризиране на получените полимерни структури

3.3.1. Динамично светоразсейване

Размерите на получените хидрогелни частици са определени чрез Nanotracs particle size analyzer (Microtrac, York, PA, USA) с помощта на хелий/неонов лазер с мощност 3 mW и при дължина на вълната от 780 nm.

3.3.2. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

За охарактеризиране на морфологията на структурите се използват малки образци в сухо състояние, които се металлизират с 5 nm златно покритие във вакуумна среда с QUORUM Q 150T ES Plus. Изображенията се получават чрез ускоряване на електрони с енергия между 10 и 15 kV (Prisma E SEM, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.3.3. Атомно-силова микроскопия (АСМ)

Обем от 150 μl от разтвор на частиците се накапва върху микроскопско стъкло и се оставя да изсъхне. Така получените образци се изследват в режим на периодичен контакт с атомно-силов микроскоп Nanosurf FlexAFM (Nanosurf AG, Liestal, Switzerland) с кантилевер с 10 nm радиус на върха от типа Tap190Al-G.

3.3.4. Добиви

За всяка разработена система е изчислен добивът като количествена характеристика на ефективността на процеса на получаването им. За пресмятането е използван следния израз:

$$\text{Добив (\%)} = \frac{\text{Маса на получения образец}}{\text{Сума от масите на използваните вещества}} \times 100 \quad (\text{III.1.})$$

3.3.5. Количество включено лекарство

За да се определи ефективността на включване (ЕВ) на лекарството, са използвани два метода в зависимост от типа разработена система – пряк и косвен.

3.3.5.1. Пряк метод

При този метод 10 или 20 mg сухи частици се поставят в торбичка от диализна мембрана, потопена в обем от 10 mL от желаната среда (дестилирана вода, разтвор на оцетна киселина или буфер) за 72 часа. По предварително подготвена калибрационна крива се пресмята освободеното количество лекарство при дължина на вълната 306 nm в 1 mL от средата и се преизчислява за масата на образца. Резултатите се пресмятат посредством израза:

$$\text{ЕВ (\%)} = \frac{\text{маса на включеното лекарство}}{\text{маса на изследвания образец}} \times 100 \quad (\text{III.2.})$$

3.3.5.2. Косвен метод

Косвеният метод за определяне на ЕВ се основава на отчитане на екстинкцията на получения супернатант след първата стъпка на центрофугиране на образците. Включеното количество лекарство се изчислява по следната формула:

$$\text{ЕВ (\%)} = \frac{(\text{начално кол.} - \text{кол. в супернатанта})}{\text{начално количество}} \times 100 \quad (\text{III. 3.})$$

3.3.6. Фурие-трансформирана инфрачервена спектроскопия (ФТИР)

Използван е апарат Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA с режим на работа на отслабено пълно отражение с диамантена глава Nicolet iS 10 FTIR, сканиращ в диапазона от 600 до 4000 cm^{-1} с резолюция на сканирането от 4 nm и 64 броя сканирани линии.

3.3.7. Диференциално сканираща калориметрия (ДСК)

Термичната стабилност и фазовото състояние на веществата, включени в състава на крайните структури, са изследвани с помощта на

диференциално сканиращ калориметър DSC 204F1 Phoenix (Netzsch Gerätebau GmbH, Selb, Germany). Изследваните образци са тествани след затваряне в алуминиеви тигли в температурен интервал от 20 °C до 300 °C със скорост на нагряване от 10 K/min.

3.3.8. *In vitro* освобождаване на бензидамин хидрохлорид

С цел установяване на профила на освобождаване на лекарственото вещество от полимерните структури, за всеки тип система са избрани определени модели частици, с които е проведен *in vitro* тест за освобождаване в среда изкуствена слюнка. За целта се подготвя фосфатен буфер с рН 6,8. Предварително изчислено количество частици, еквивалентно на 5 mg или 10 mg включено лекарство, се поставят в торбичка от диализна мембрана с 1 mL буфер и тази торбичка се потапя в 20 или 30 mL от буфера. Освобождаването се осъществява при температура от $37 \pm 0,5$ °C и постоянно разбъркване на магнитна бъркалка със скорост 50 rpm. През предварително определени времеви интервали се взимат проби от акцепторната среда. Същият обем чист буфер се добавя към средата, а пробите се анализират спектрофотометрично при дължина на вълната 307 nm съгласно предварително разработена калибрационна крива. Построява се зависимостта на количеството освободено лекарство в проценти от времето.

3.3.9. Математични модели, използвани за описване на процеса на освобождаване

Математичните модели са подходящ помощен инструмент за по-добро описание и разбиране на процеса на освобождаване на лекарството от полимерната матрица. Моделите, приложени за настоящите анализи, са: модел от първи порядък, модел на Хигучи, модел на Корсмейер-Пепас и модел на Вайбул.

- Модел от първи порядък

$$\log C = \log C_0 - Kt/2,303, \quad (\text{III.4})$$

където: C_0 - начална концентрация на лекарство; K - скоростна константа на освобождаване от първи порядък, изразяваща се в s^{-1} ; t – време за освобождаване.

- Модел на Корсмейер-Пепас

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n, \quad (\text{III.5})$$

където: $\frac{M_t}{M_\infty}$ - частта от лекарството, освободена за време t ; K - константа на специфичната скорост на отделяне; n - степенния показател на освобождаване.

- Модел на Хигучи

$$Q = K_H t^{1/2}, \quad (\text{III.6.})$$

където: Q – натрупаноосвободено лекарство в момента t ; K_H – константа на Хигучи, която определя механизма на освобождаване; t – време за освобождаване

○ Модел на Вайбул:

$$M = M_0 \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right], \quad (\text{III.7.})$$

където: M – количество лекарство, освободено от матрицата в момент от времето t ; M_0 – пълното количество на лекарството, което се отделя от системата; T – параметър, който отговаря за закъснението в измерваното време в резултат на процеса на разтваряне, за нашите системи винаги $T = 0$; a – описва зависимостта от времето; b – описва формата на кривата на разтварянето, заема стойности от 0 до 1.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Формиране на частици от хитозан чрез йонотропно желиране в присъствие на натриев триполифосфат

Йонотропното желиране се осъществява в резултат на електростатично взаимодействие между протонираните NH_3^+ групи в молекулите на хитозана и отрицателно заредените фосфатни групи в омрежителя (Antoniou et al. 2015).

Разработени са 5 типа частици от хитозан, натоварени с бензидамин хидрохлорид при вариране на концентрацията на полимера (0,1 % w/v; 0,2 % w/v и 0,3 % w/v) и отношението полимер:омрежващ агент (хит:NaTPP = 3:1; 5:1 и 7:1). Получените хидрогелни частици са охарактеризирани спрямо своите размери и разпределение по размери, добив и ефективност на включване на лекарственото вещество. Параметрите и характеристиките на получените гелни частици са представени в таблица IV.1.1.

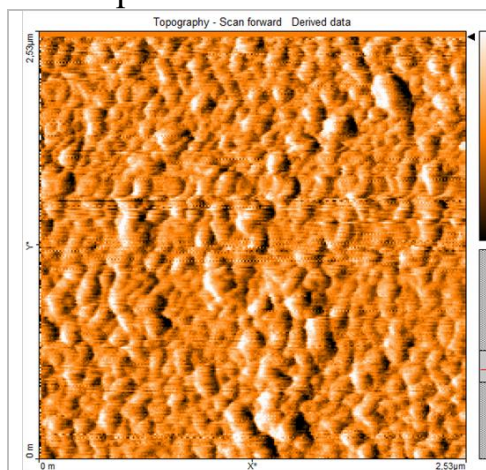
Таблица IV.1.1.: Размери, добив и ефективност на включване на разработените частици при вариране на концентрацията на полимера или омрежителя ($n=3$).

Образец	Конц. на Chit., %	Отношение Chit:NaTPP	Добив \pm SD, %	Размери \pm SD, nm	ЕВ \pm SD, %
F1	0,1	3:1	56 \pm 4	81 \pm 3	14,7 \pm 0,2
F2	0,1	5:1	47 \pm 2	63 \pm 4	10,5 \pm 0,3
F3	0,1	7:1	23 \pm 3	25 \pm 1	12,5 \pm 0,4
F4	0,2	7:1	61 \pm 5	460 \pm 15	9,9 \pm 0,1
F5	0,3	7:1	69 \pm 4	588 \pm 23	24,3 \pm 0,4

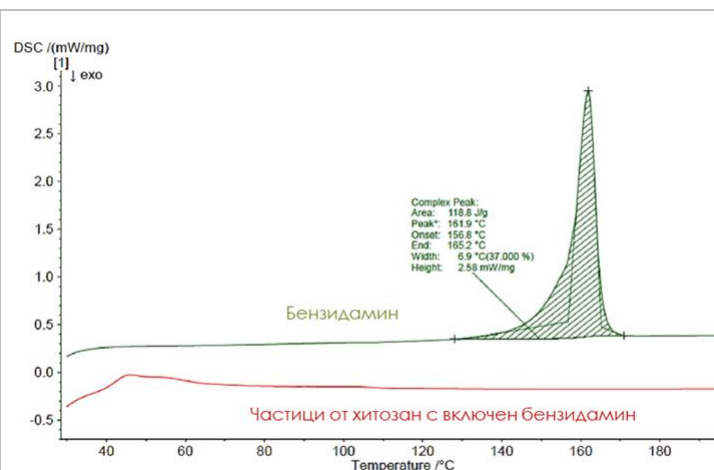
При повишаване на концентрацията на полимера, се наблюдава значително нарастване на средния диаметър на частиците, което е в съответствие с предишни изследвания от друг колектив (Rampino, et al.

2013). Забелязва се, че и добивът на процесът на желиране значително нараства за системите с по-висока концентрация на полимера, като варира от 23 % до 69 %. При използването на по-концентрирани разтвори, се получават значително по-големи частици, които по-лесно се отделят от средата на получаване. Аналогичен е и ефекта на омрежителя. При взаимодействието на хитозан с триполифосфат се формират както вътрешно, така и междумолекулни връзки посредством физично омрежване (Thandapani, et al. 2017). При използването на по-висока концентрация на полимера, по-голям брой макромолекули се омрежват или участват във формирането на гелната мрежа, заради намаленото разстояние между отделните вериги. Затова се наблюдава повишаване в средния хидродинамичен диаметър на формираните частици (Kalam, et al. 2016). При използване на по-голямо количество омрежител, гелната мрежа е по-плътна и това води до подобряване на ефективността на включване. Стойностите на ефективността на включване на лекарството са относително ниски – между 10 % и 25 %.

При изследването на морфологията на получените структури посредством атомно-силова микроскопия (фиг. IV.1.1.), се наблюдават отделни морфологични единици с правилна овална форма и размери близки до тези, определени посредством динамичното светоразсейване. В същото време се забелязва силна агрегация на отделните частици в по-големи агломерати.



Фиг. IV.1.1.: Атомно-силова микрофотография на Хит (0,1%): NaTRP = 3:1, размерност 2,5 x 2,5 μm

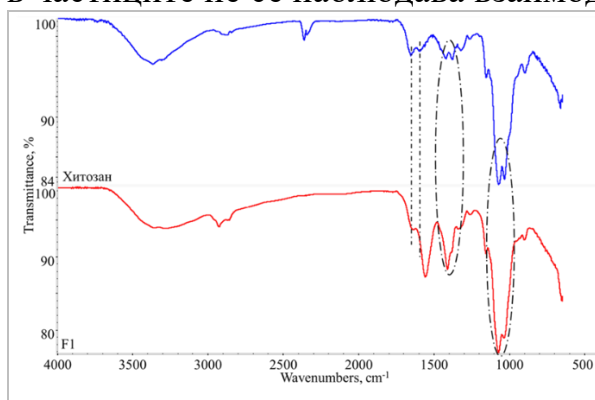


Фиг. IV.1.2.: Термограма на: чист ВНСІ (зелена линия); включен в хитозанови частици ВНСІ (червена линия)

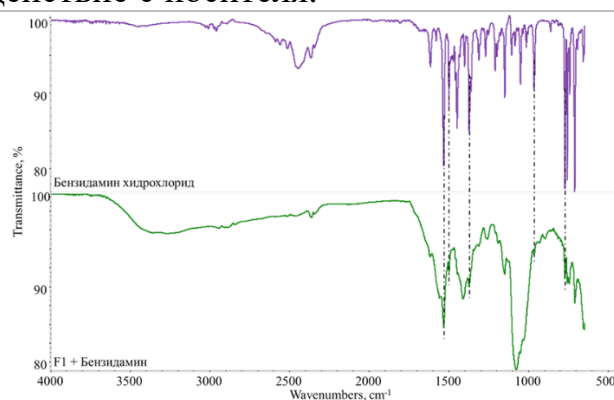
Чрез метода на ДСК е изследвано фазовото състояние и термичната стабилност на активното вещество преди и след включването му в хитозанови частици – фиг. IV.1.2. Бензидамин хидрохлоридът представлява водоразтворима сол на основното вещество бензидамин и се характеризира

със силно проявено кристално фазово състояние (Alves, et al. 2020). При изследването на чистото вещество е установено, че то се топи при температура 161,9 °C и енталпията на този преход е 118,85 J/g. В термограмата на включеното в частици лекарство, ясно се вижда липсата на пик в диапазона около температурата на топене на бензидамина, което означава, че той се намира в аморфно фазово състояние.

Физичното омрежване на хитозановите частици и успешното включване на лекарството в полимерната матрица са потвърдени чрез ФТИР (фиг. IV.1.3. и фиг. IV.1.4). При включването на бензидамин хидрохлорида в частиците не се наблюдава взаимодействие с носителя.



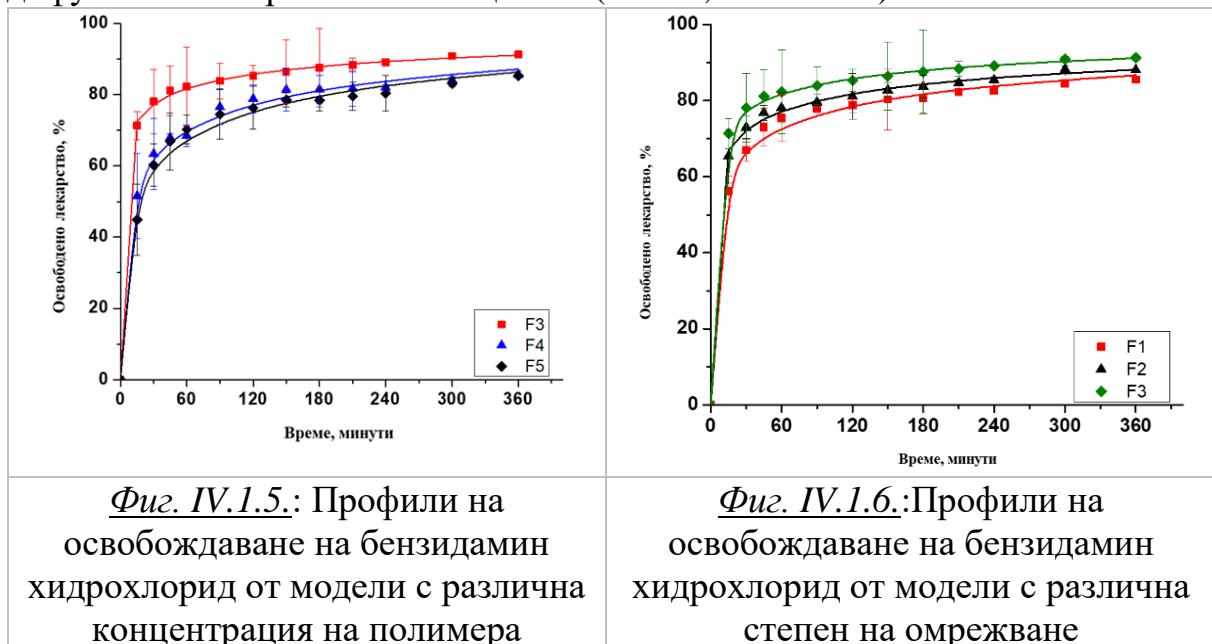
Фиг. IV.1.3.: ФТИР спектри на: хитозан (синьо) и хитозан, омрежен с натриев триполифосфат (червено)



Фиг. IV.1.4.: ФТИР спектри на: ВНСІ (лилаво) и частици, натоварени с ВНСІ (зелено)

Резултатите от *in vitro* симуляция на освобождаване на ВНСІ при рН = 6,8 са представени на фиг. IV.1.5. и фиг. IV.1.6. Профилът на освобождаване на лекарството за всички системи е двуфазен, характеризиращ се с начален “burst effect“, последван от забавено и продължително освобождаване, което е непълно за период от 6 часа. Забелязва се, че най-бързо освобождават частиците, получени от разтвор с най-ниска концентрация на полимера. Повишаването на нейната стойност на 0,2% и 0,3% води до забавяне на освобождаването. Това забавяне се дължи на формиране на слой от гела в резултат на набъбването на хитозана, който затруднява дифундирането на лекарството към акцепторната среда (Katsarov, et al. 2017). Най-бързо освобождават частиците с най-малко количество омрежител (хит:NaTRP = 7:1), последвани от тези с отношение хит:NaTRP = 5:1 в полза на полимера и най-бавно освобождават тези с най-ниско съотношение на полимера и натриевия триполифосфат (хит:NaTRP = 3:1). Това се дължи на намаленото пространство между отделните макромолекули и наличието на заплитане в тях (Ferreira Tomaz, et al. 2018). В резултат, дифузията е затруднена, а от там и количеството на освободеното лекарство е по-ниско. В допълнение, частиците с по-малко количество омрежител, са и с по-малки размери, което води до по-голяма

контактна повърхност между частиците и външната среда и по-лесна дифузия на лекарственото вещество (Gokse, et al. 2014).



След получаване и обработване на резултатите от освобождаването, същите бяха анализирани и моделирани чрез регресионен анализ спрямо избраните математични модели. Оптимален модел, на база стойността на коефициента на детерминация R^2 и резидиумите, изведени от използвания софтуер, е този на Вайбул. Според получените стойности за параметъра b , който определя формата на кривата, може да се определи и типа механизъм, отговорен за процеса на освобождаване. Corsaro et al. (2021) публикуват, че за стойности на b по-малки от 0,75, механизмът на освобождаване е Фикова дифузия. За всички представени типове частици стойността на този параметър е дори по-малка от 0,3, което означава, че процесът на освобождаване е изцяло подчинен на Фикова дифузия, т.е. в тези случаи не се наблюдава разтваряне на лекарство-доставящата система при контакта ѝ с акцепторната среда, а само набъбване.

IV.2. Формиране на частици от казеин чрез йонотропно желиране в кисела среда

В настоящето изследване по метода на йонотропното желиране са разработени частици от казеин, омрежен с натриев триполифосфат в условия на силно кисело рН, далеч от изоелектричната точка на протеина. Получени са системи на базата на разтвори с различна концентрация на полимера (1% w/v, 2% w/v) различни отношения с омрежителя (3:1, 5:1, 10:1) и наличие (5% v/v) или липса на етилов алкохол.

На база резултатите от динамичното светоразсейване се забелязва, че всички получени образци са с размери в диапазона от около $(0,9 \pm 0,1) \mu\text{m}$ до $(4,3 \pm 0,1) \mu\text{m}$ (таблица IV.2.1.). Прави впечатление, че тези размери са значително по-големи спрямо същите на частици, получени в рН над

неутралното, където казеинът е отрицателно зареден (Głab, et al., 2017). Когато протеинът се разтваря в $pH < 4,6$, то обвиващият слой от като к-казеин се разгражда, което води до намаляването на заряда по повърхността на мицелите, а от там и до тяхната агрегация (Vasbinder, et al., 2003).

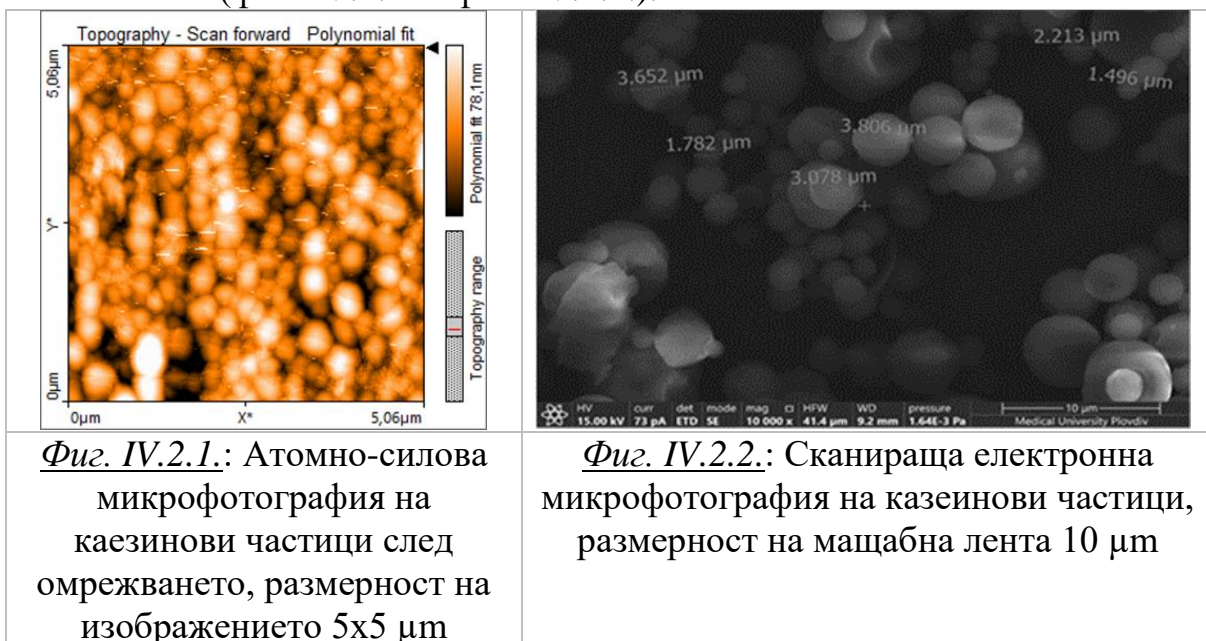
Таблица IV.2.1.: Размери, добиви и ефективност на включване на различните типове частици (n=3)

Проба	Конц. на Cas, % w/v	Отн. Cas:NaTPP	Конц. на етанол, % v/v	Размери \pm SD, μm	Добив \pm SD, %	ЕВ \pm SD, %
S1	2	3:1	5	3,9 \pm 0,1	64,4 \pm 3,4	14,7 \pm 0,8
S2	2	5:1	5	3,2 \pm 0,1	75,7 \pm 4,8	22,2 \pm 1,2
S3	2	10:1	5	2,2 \pm 0,1	68,9 \pm 4,0	9,9 \pm 0,5
S4	2	3:1	0	2,0 \pm 0,1	66,6 \pm 4,9	19,2 \pm 1,0
S5	2	5:1	0	0,9 \pm 0,0	73,8 \pm 4,3	22,4 \pm 1,3
S6	2	10:1	0	2,4 \pm 0,1	55,3 \pm 3,6	5,4 \pm 0,3
S7	1	3:1	5	2,5 \pm 0,1	65,2 \pm 4,6	8,0 \pm 0,5
S8	1	5:1	5	1,6 \pm 0,0	76,1 \pm 4,3	13,7 \pm 0,8
S9	1	10:1	5	4,3 \pm 0,1	72,5 \pm 4,2	4,6 \pm 0,3
S10	1	3:1	0	1,2 \pm 0,0	63,9 \pm 4,6	18,2 \pm 0,9
S11	1	5:1	0	2,1 \pm 0,1	71,4 \pm 4,4	12,5 \pm 0,7
S12	1	10:1	0	2,2 \pm 0,1	78,3 \pm 4,9	10,6 \pm 0,6

В резултат на това, се наблюдават значително по-големи частици с голяма склонност към формиране на агрегати. Склонността към формиране на агрегати с по-големи размери се засилва с понижаването на концентрацията на полимера и наличието на етанол. Това вероятно се дължи на нарушената стабилност на мицела, не само заради отсъствието на к-казеина, а и заради наличието на алкохол. Този ефект е известен като етанол индуциран колапс на мицела. Изразява се в два основни ефекта: дестабилизиране поради нарушаване на повърхностния грапав слой и промени в равновесието на калциевия фосфат, докладван и наблюдаван още през 1985 г. Наличието на омрежител в по-висока концентрация в общия случай води до намаляване на размерите, поради формирането на по-плътна опакова на мицелите, вероятно и повърхностния заряд на частиците е повишен, което води до взаимното им отблъскване и стабилизиране в колоидната система. По-ниската концентрация на омрежителя е предпоставка за формиране на по-рехав мрежа между отделните вериги и мицели, което ги прави по-податливи на набъбване в разтвор. В системите, получени от разтвори с по-високата концентрация на казеина и наличие на етанол, се наблюдава обратна тенденция за размерите спрямо частиците без етанол. Всички получени типове частици се характеризират с относително висок добив – между 55% и 78%, като той не се влияе от наличието на

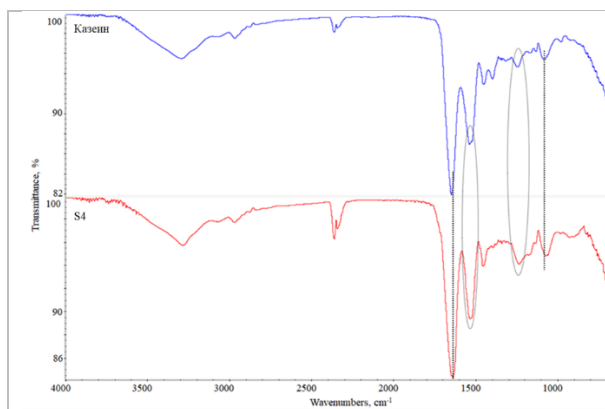
етанол. Въпреки значително по-добрия добив в сравнение с хитозанови частици, получени по същия метод, ефективността на включване на бензидамина е сходен с тяхната и варира от 4,6% до 22,4%. Повишаването на концентрацията на полимера води до повишаване на ефективността на включване на бензидамин в частиците, вероятно поради засилен хидрофобен ефект, благоприятстващ захващането на лекарството в казеиновите мицели (Elzoghby, et al. 2013a). При намаляването на концентрацията на омрежителя, ефективността на включване на лекарството също е по-малка. Вероятно при по-ниската степен на омрежване се получава прекалено рехавя и пореста полимерна мрежа.

Морфологията на получените частици бе изследвана посредством АСМ и СЕМ (фиг. IV.2.1. и фиг. IV.2.2.).

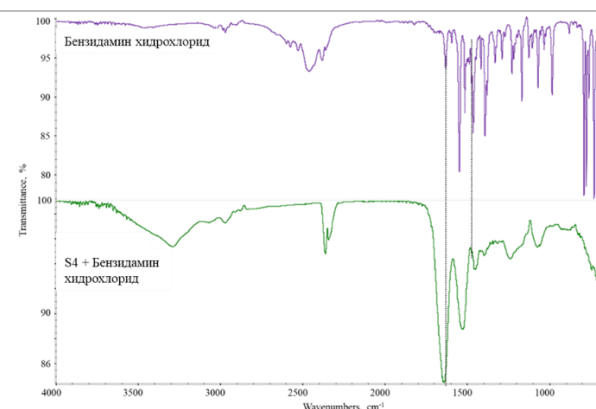


И при двете техники формата на частиците е преобладаващо овално-сферична, но се наблюдават и дефекти. Според Elzoghby et al. (2013b), в киселинни условия казеиновите мицели могат да се стабилизират стерично, подобно на полиелектролитните четки, дори при високи концентрации на омрежителя, съответно по-нисък повърхностен заряд. Заради това се наблюдават отчетливо и ясно отделени казеиновите частици.

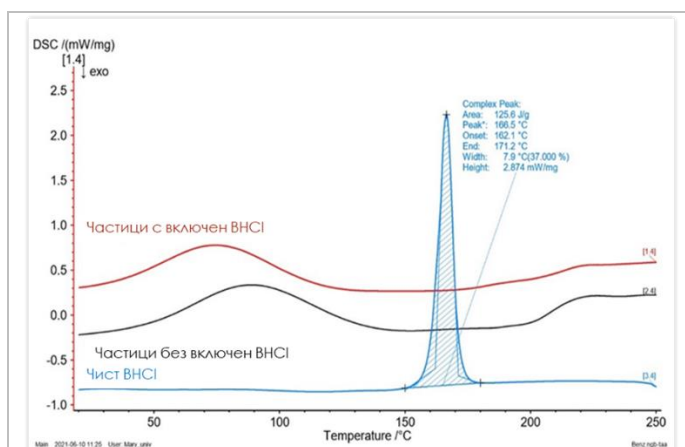
Омрежването на казеин от натриев триполифосфат при рН под изоелектричната точка на протеина бе потвърдено посредством ФТИР (фиг. IV.2.3. и фиг. IV.2.4.). Поради липса на изменение или отместване на характеристичните пикове на лекарството считаме, че то присъства физически в частиците, без наличие на структурни изменения или взаимодействия.



Фиг. IV.2.3. : ФТИР спектри на: казеин (синьо), казеин омрежен с натриев полифосфат (червено)



Фиг. IV.2.4.: ФТИР спектри на: ВНСI (лилаво), омрежени частици, натоварени с ВНСI (зелено)



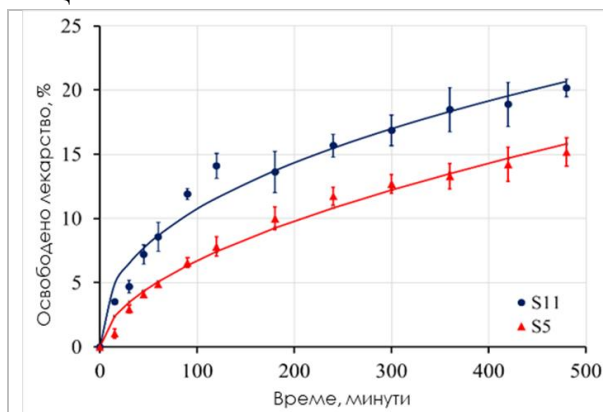
Фиг. IV.2.5.: Термограми на: синя линия – ВНСI (синя линия), празни частици (черна линия), – натоварени с ВНСI частици (червена линия)

Фазовото състояние на включения ВНСI е установено чрез метода на ДСК (фиг. IV.2.5.). В термограмата на празните казеинови частици е наличен широк ендотермичен пик при температура около 90 °C, съответстващ на изпарението на свързаната вода в пробата. Другият ендотермичен пик в същата термограма се наблюдава при температура над 200 °C и се дължи на термична деструкция на протеиновите вериги. В

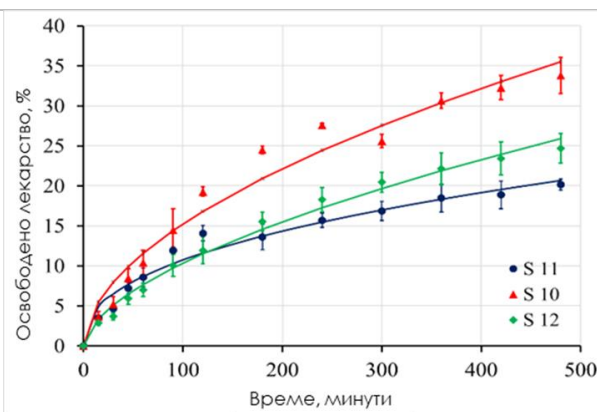
частиците, натоварени с лекарственото вещество, не се наблюдават други пикове, които да съответстват на топенето на бензидамина, което води до заключението, че той е преминал в аморфно състояние.

Кумулативното освобождаване на бензидамин хидрохлорида от казеинови частици при различна концентрация на полимера и омрежителя бе проведено в буфер при рН 6,8 и температура 37.0 ± 0.5 °C за период от 8 часа (фиг. V.2.6. и фиг. V.2.7.). За всички изследвани системи се наблюдава непълно освобождаване между 15% и 32% за този период, без наличие на “burst effect”. Наблюдаваното е в потвърждение с хипотезата, че бензидаминът е включен плътно в мицелните структури във вътрешността на сферите и в резултат на това, процесът на освобождаване ще продължи по-дълго време. Забавянето на освобождаването с повишаването на концентрацията на полимера от 1% на 2%, е допълнително потвърждение за това допускане, поради формирането на плътна протеинова мрежа и

затруднена миграция на лекарството във вън от нея. По-интересно поведение имат частиците с различна степен на омрежване. За първите 8 часа, най-бързо освобождава най-силно омрежената система частици. Но при по-нататъшно продължение на експеримента за 72 часа, се установява, че тази тенденция се променя (таблица IV.2.2.). За този времеви период, отново се наблюдава непълно освобождаване, но тенденцията за пробите с различна концентрация на омрежителя се променя. На края на 72-рия час, най-голямо количество е освободила системата с най-малко омрежител, а най-малко – тази с най-плътна мрежа. Формирането на плътна полимерна мрежа затруднява набъбването, поради формирането на своеобразна бариера. Така наблюдаваният резултат за най-плътна омрежената система за 8-часовия период, е възможно да се дължи на натрупване на известно количество лекарство в периферните области, а не в ядрото, поради плътната мрежа от мицели.



Фиг. IV.2.6.: Профили на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от системи с различна концентрация на казеин



Фиг. IV.2.7.: Профили на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от системи с различна степен на омрежване

Таблица IV.2.2.: Количество освободен ВНСI след 8 ч., 24 ч. и 72 ч. (n=3)

Проба	Количество освободено лекарство в mg \pm SD след:		
	8 ч.	24 ч.	72 ч.
S10	33,8 \pm 2,2	51,2 \pm 3,9	85,9 \pm 6,7
S11	20,2 \pm 0,7	39,3 \pm 4,3	90,1 \pm 9,0
S12	24,7 \pm 2,5	44,5 \pm 2,6	94,6 \pm 3,8

За да се обясни механизмът на освобождаване от казеиновите структури, данните от освобождаването до 8-мия час са моделирани спрямо избрани математични модели. На база стойността на коефициента на детерминация R^2 и резидуумите, изведени от използвания софтуер, най-подходящ за описанието на процеса на освобождаване е моделът на Корсмайер-Пепас. За всички изследвани образци параметърът n има стойност, по-голяма от 0,45, което показва аномална нефикова дифузия

(Bruschi, 2015). При нея се наблюдава както освобождаване поради дифузия, така и поради набъбване.

IV. 3. Формиране на полиелектролитен комплекс хитозан/казеин при различни отношения на комплексообразуващите партньори

Бяха получени и охарактеризирани полиелектролитни комплекси на базата на казеин и хитозан в условията на слабо киселинно рН=6. При избраното работно рН, двата полиелектролита са противоположно заредени и могат да взаимодействат електростатично. Разработени са 5 типа комплекса при различно стехиометрично отношение, изчислено на база степените им на йонизация и молекулните маси на елементарните звена – 2 при излишък на казеин, 2 при излишък на хитозан и 1 стехиометричен. С цел улесняване на формирането на комплексите и избягване на агрегацията им, бяха третирани с ултразвук.

Таблица IV.3.1.: Размери, добив и ефективност на включване на комплекси с различна стехиометрия (n=3)

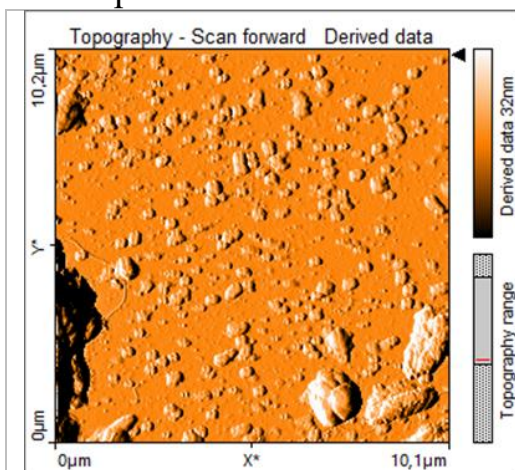
Образец	Отн. на заредените COO⁻/NH₃⁺ групи	Размери ± SD, μm	Добив ± SD, %	ЕВ ± SD, %
5:1	5:1	0,90 ± 0,08	83,5 ± 2,5	30 ± 2
3:1	3:1	0,40 ± 0,07	72,4 ± 4,3	16 ± 3
1:1	1:1	0,39 ± 0,04	47,5 ± 3,7	15 ± 2
1:3	1:3	0,61 ± 0,05	26,7 ± 1,8	20 ± 1
1:5	1:5	1,74 ± 0,11	18,4 ± 0,2	22 ± 2

Размерите на получените комплекси варират в диапазона от около 400 nm до 1,8 μm, като силно се влияят от стехиометрията на съответния комплекс (таблица IV.3.1). Най-малките размери са наблюдавани за стехиометричния комплекс, поради получаването на много плътна мрежа в резултат на пълното взаимно компенсиране на зарядите на комплексообразуващите полиелектролити. При отношение 1:5 в полза на хитозана се наблюдава най-голяма стойност за хидродинамичния радиус, поради високата склонност на комплекса да набъбва. Хитозанът е силно хидрофилна макромолекула с висок нетен заряд и във водна среда лесно преминава в разгъната конформация, което води до по-рехвава структура. За разлика от него, казеинът има както хидрофилни, така и хидрофобни домени, които спомагат за самоподреждането на полипептидните вериги в по-плътни мицелни опаковки. Наблюдава се ясна тенденция на повишаване на добива с увеличаване на количеството казеин, вложено в комплексите. Най-ниската стойност е при образец 1:5 в излишък на хитозан – 18,4% и най-висок при отношение 5:1 в излишък на казеин – 83,5%.

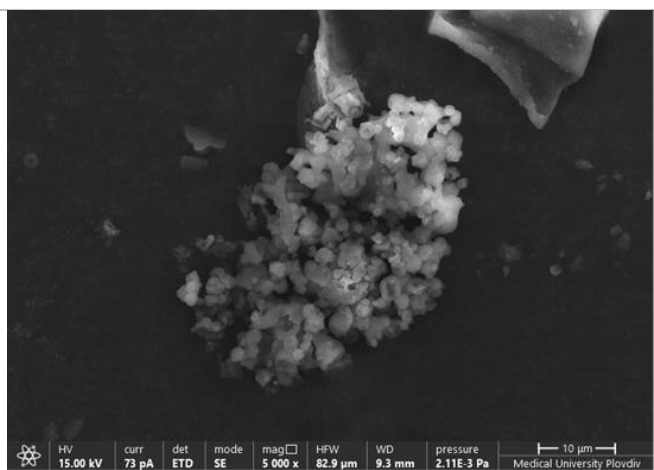
Ефективността на включване на бензидамин варира от 15% до 30%, като е най-висок а в системата с излишък на казеин. За разработените системи с бензидамин хидрохлорид, това поведение вероятно е резултат от

два фактора: приоритетно захващане на лекарството във вътрешността на комплекса, по-точно в казеиновите мицели и потенциално електростатично взаимодействие с него при тези рН условия. Това би обяснило и факта, че най-ниската стойност за ефективността на захващане се наблюдава за системата, в която йоните на двата полиелектролита са с съотношение 1:1, поради формирането на прекалено плътна мрежа, непозволяваща включването на голям брой лекарствени молекули в себе си.

Морфологията на образец 1:1, изследвана с АСМ и СЕМ, е представена съответно на фиг. IV.3.1. и фиг. IV.3.2. На микрофотографията от АСМ се наблюдават, както отделни, така и агрегирани комплекси. Морфологията им е близка до сферична, но са налице и някои неправилни овали. Изображението от СЕМ показва частици с различна форма: сферични, сферични с грапава повърхност и такива с неправилна форма и грапава повърхност. Виждат се както отделни частици, така и големи агломерати.



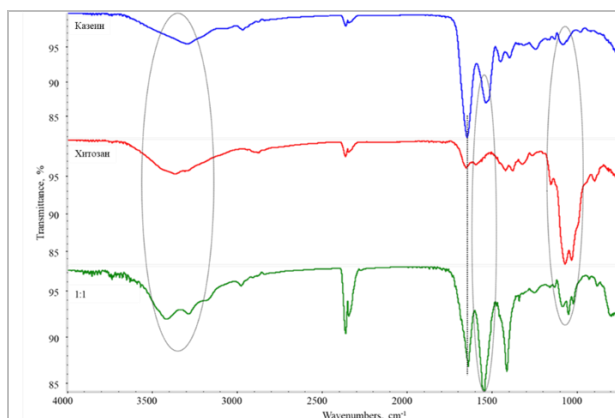
Фиг. IV.3.1.: Атомно-силова микрофотография на комплекси, размерност на изображението 10x10 μm



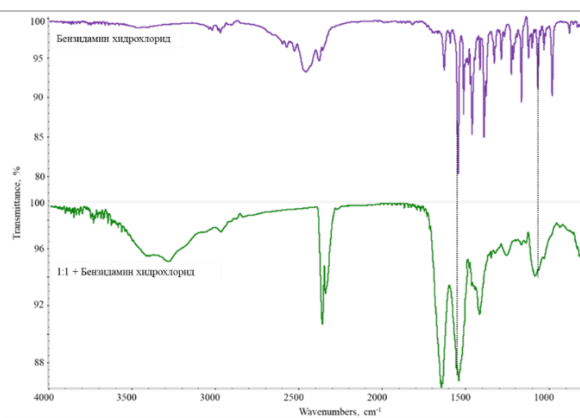
Фиг. IV.3.2.: Сканираща електронна микрофотография на комплекси, размерност на мащабна лента 10 μm

Възникването на полиелектролитен комплекс между двата полимера се потвърждава чрез промяна в характеристикните им ивици в общия спектър (фиг. IV. 3.3.). Включването на лекарството в полиелектролитния комплекс, възникнал между протеина и полизахарида, се потвърждава след сравняване на двата спектъра на фиг. IV.3.4.

Термичното поведение на стехиометричния комплекс и фазовото състояние на лекарството преди и след включването му в частици е изследвано чрез ДСК и представено на фиг. IV.3.5. В термограмата както на празния, така и на натоварения с лекарство комплекс, се забелязва широк ендотермичен пик. Той се дължи на изпаряване на свързаната вода от полимерната структура.

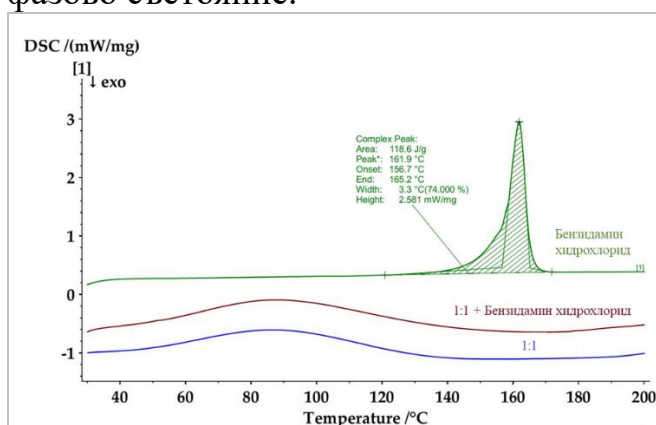


Фиг. IV.3.3.: Инфрачервени спектри на: казеин (синьо), хитозан (червено), полиелектролитен комплекс между казеин и хитозан (зелено)

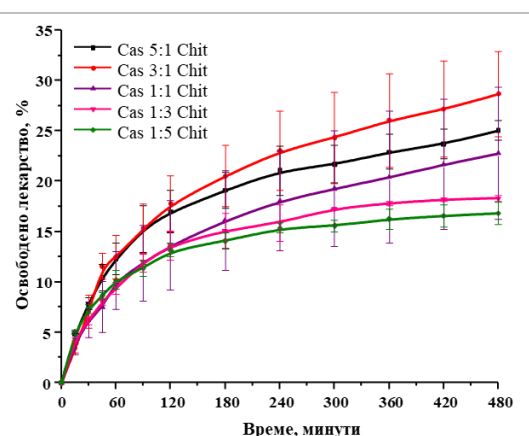


Фиг. IV.3.4.: Инфрачервени спектри на: ВНСІ (лилаво), полиелектролитен комплекс натоварен с ВНСІ (зелено)

Други термични събития не са наблюдавани за натоварения с лекарство комплекс, което означава, че бензидаминът е преминал в аморфно фазово състояние.



Фиг. IV.3.5.: Термограми на: ВНСІ (зелена линия); празни частици (синя линия); пълни с лекарство частици (червена линия)



Фиг. IV.3.6.: Профили на освобождаване на ВНСІ от полиелектролитрни комплекси с различна стехиометрия

Профилът на освобождаване от всички разработени комплекси в среда „изкуствена слюнка“ е представена на фиг. IV.3.6. Както се вижда, профилът на освобождаване е много сходен с този от частиците на база казеин, което допълнително насочва към хипотезата, че бензидаминът е захванат основно в казеиновите мицели. За всички образци се наблюдава непълно освобождаване за период от 8 часа, като стойностите за освободеното количество лекарство варират между 17% (система Cas:Chit = 1:5) и 29% (система Cas:Chit = 3:1). Въпреки, че най-малките размери се наблюдават за образец Cas:Chit = 1:1, най-бързо най-голямо количество освобождава

образецът 3:1. Двата образца имат доста сходни размери, но този, който е нестехиометричен има по-рехава полимерна мрежа, която е способна да набъбне в по-голяма степен. При рН условията на симулацията на освобождаване, казеинът добива още по-висок заряд, спрямо този, при който е формиран комплекса. Поради по-високата стойност на нетния заряд на протеина, полизахаридът не е способен вече да го неутрализира, което прави мрежата по-рехава. Най-бавно освобождава комплексът в най-голям излишък на хитозан, вероятно заради най-големия наблюдаван размер на структурата. На база на получените стойности за параметрите на приложените математични модели, като оптимален модел, който описва профила на освобождаване на бензидамина, бе определен този на Корсмайер-Пепас. Стойностите, получени за степенния показател n от уравнението показват, че процесът на освобождаване на лекарството от матрицата се дължи основно на Фикова дифузия. При тези условия на рН, полиелектролитните комплекси са стабилни и лекарството може да дифузира от ядрото на комплекса към периферията му, без да настъпва повърхностна или обемна ерозия в структурата.

IV. 4. Формиране на частици от хитозан по метода на разпръсквателното сушене в присъствието на омрежител или помощно вещество

Разпръсквателното сушене е метод, чрез който в една стъпка се получава директно продукт под формата на сух прах. След първоначално оптимизиране на работните параметри на процеса на разпрашаване, са разработени 9 типа частици: 3 с различна концентрация на полимера, 3 с различно отношение полимер:омрежител и 3 с различно отношение полимер:ексципиент. Тези варианти са избрани с цел оценка на влиянието на омрежителя и ексципиента върху свойствата и поведението на разпрашените частици при процеса на освобождаване на включен бензидамин хидрохлорид. Конкретният състав на разпрашените полимерни частици и стойностите на варираните параметри, заедно със средните размери и индексът на полидисперсност са представени в таблица IV.4.1. :

Таблица IV.4.1.: Състав на частиците, среден размер и индекс на полидисперсност ($n=3$)

Образец	Състав на образца	Размери, μm	SD	PDI
C1	0,1% Хитозан	1,827	0,022	0,369
C2	0,2% Хитозан	2,397	0,339	0,264
C3	0,3% Хитозан	2,487	0,107	0,218
CN1	0,2% Хитозан + 0,05% NaTPP	3,002	0,109	0,194
CN2	0,2% Хитозан + 0,1% NaTPP	3,033	0,611	0,261
CN3	0,2% Хитозан + 0,5% NaTPP	3,739	0,474	0,308
CM1	0,2% Хитозан 1 : 5 Манитол	4,165	0,147	0,177
CM2	0,2% Хитозан 1 : 7.5 Манитол	6,555	0,202	0,210
CM3	0,2% Хитозан 1 : 10 Манитол	8,840	0,377	0,508

Забелязва се, че частиците само от хитозан с концентрация 0,1% имат най-малкия размер и стандартно отклонение. При повишаване на концентрацията на хитозана до 0,2% и 0,3%, поради увеличаването на вискозитета на разтвора, размерът на структурите е по-голям. Такава тенденция е отчетена и от Katsarov et al. (2017) при характеризирането на хитозанови частици посредством факториален дизайн. В основата на увеличаването на размера са два фактора: повишаване на броя на хитозановите молекули в единица обем и последващо увеличаване на вискозитета на разтвора. След добавянето на омрежител, дори и с най-ниското теглово отношение 0,05% спрямо полимера, размерът на частиците нараства. Когато количеството омрежител се повиши до 0,5%, размерът е с почти 50% по-голям спрямо същите неомрежени частици. Нарастването се дължи на по-голямото количество фосфатни йони, налични от повишената концентрация на омрежител, които формират мрежа с по-голям брой хитозанови вериги, както е докладвано от Wei et al. (2020). Използването на ексципиента манитол води до нарастване на размера на частиците между 2 и 4 пъти в зависимост от концентрацията му, спрямо този без него. Добивите и ефективността на включване на бензидамин са представени в таблица IV.4.2. .

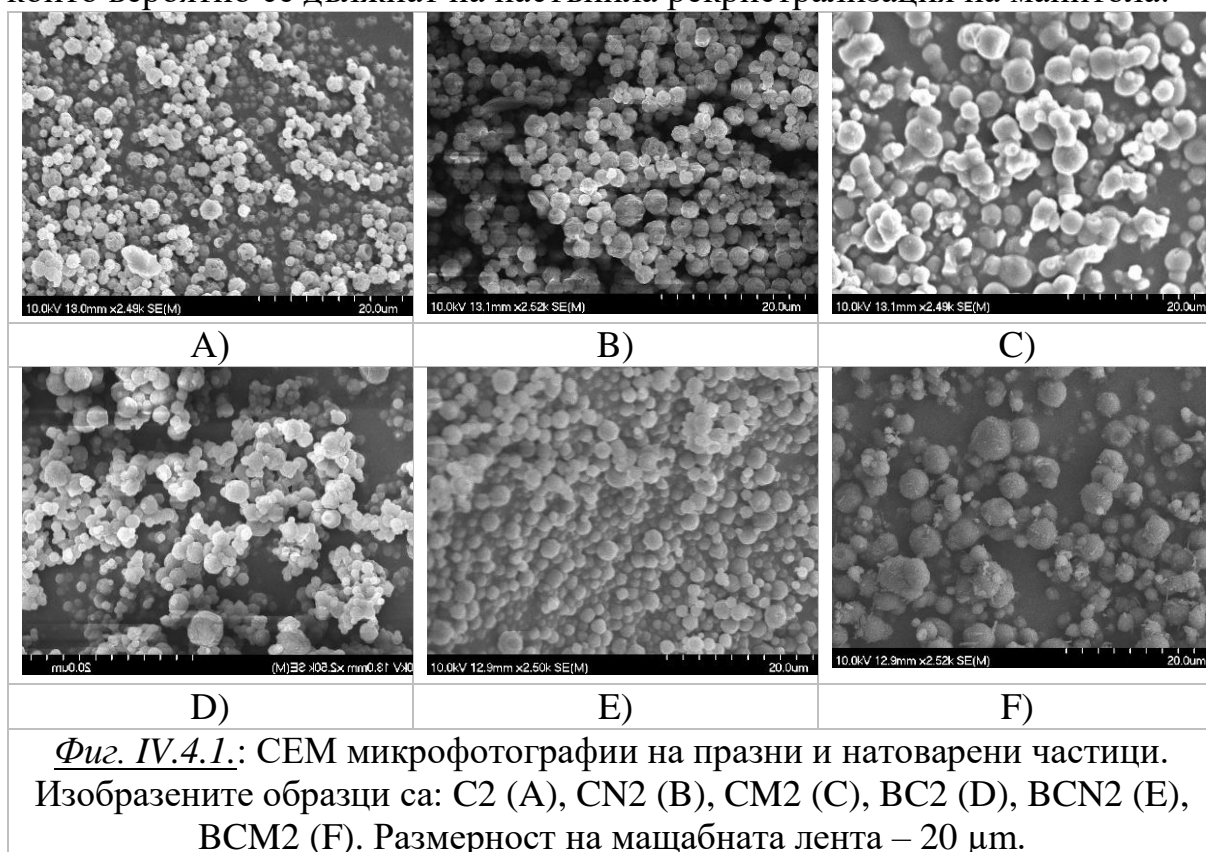
Таблица IV.4.2.: Добиви и ефективност на включване на частици с различен състав (n=3)

Образец	Състав на образца	Добив \pm SD, %	ЕВ \pm SD, %
BC1	0,1% Хитозан	17,2 \pm 0,3	11,84 \pm 0,23
BC2	0,2% Хитозан	22,7 \pm 1,1	20,98 \pm 0,06
BC3	0,3% Хитозан	21,8 \pm 2,1	23,13 \pm 0,04
BCN1	0,2% Хитозан + 0,05% NaTPP	20,6 \pm 0,9	15,67 \pm 0,06
BCN2	0,2% Хитозан + 0,10% NaTPP	14,5 \pm 0,4	20,49 \pm 0,05
BCN3	0,2% Хитозан + 0,5% NaTPP	18,5 \pm 1,4	8,73 \pm 0,06
BCM1	0,2% Хитозан 1 : 5 Манитол	21,1 \pm 2,4	17,22 \pm 0,04
BCM2	0,2% Хитозан 1 : 7.5 Манитол	38,8 \pm 4,1	16,84 \pm 0,09
BCM3	0,2% Хитозан 1 : 10 Манитол	20,1 \pm 1,8	14,73 \pm 0,05

Стойностите за добива варират от 17% (за частици, получени от 0,1 % разтвор на хитозан без добавени омрежител и ексципиент) до 38% (за частици, получени от 0,2 % разтвор на хитозан с добавен манитол в отношение полимер:ексципиент 1:7,5). Li et al. (2009) отбелязват, че традиционно лабораторните разпрашителни сушилници имат по-нисък добив от индустриалните такива. В допълнение към причините за относително ниския добив са също и геометрията на разпрашителната сушилка, както и силната адхезия на хитозановите частици, които в процес на разпрашаване полепват навсякъде по обема и стените му, както е докладвано от редица автори (Sinsuebpol, et al. 2013; Li, et al. 2009; Casanova, et al. 2016).

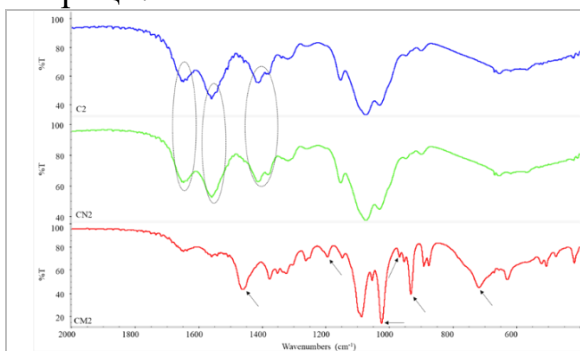
Наличието на омрежител не повлиява съществено върху добитото количество сухи частици, но наличието на ексципиент леко го повишава. Тъй като, за пресмятането на ефективността на включване на БАВ е използвана масата на полученото сухо вещество, то тенденцията за нея се повтаря.

Морфологията на избраните образци, преди и след натоварване с лекарство, е изследвана посредством сканираща електронна микроскопия и изображенията са представени на фигура IV.4.1. При системата, съставена само от хитозан, се отчита гладка повърхност, като при омрежените частици се потвърждава наблюдаваното повишаване на размера. Частиците, съставени от хитозан и манитол, са със силно изразени агрегати и наличие на грапава повърхност. Това се дължи на два основни фактора: фактът, че манитолът е кристален и различните стойности за числото на Пекле за манитол и хитозан. След натоварване на същите типове частици с моделното лекарство, морфологията на неомрежени и омрежени частици остана непроменена. В третия вид частици с ексципиент се наблюдава ясно наличието на иглоподобни формирания по повърхността на сферите, които вероятно се дължат на настъпила рекристализация на манитола.

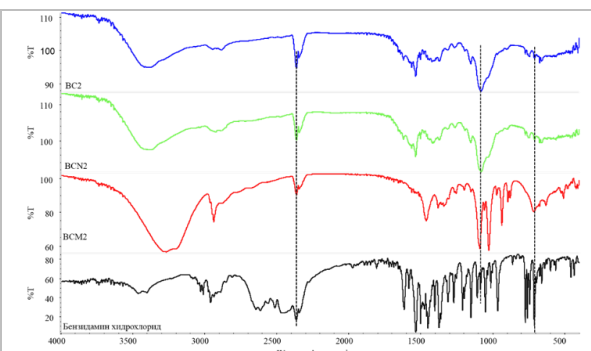


Процесът на омрежване, физичното наличие на ексципиент и успешното включване на лекарството ВНС1 в хитозановите сфери са потвърдени от приложената ФТИР спектроскопия (фиг. IV.4.2. и фиг. IV.4.3.). Поради липсата на отместване или промяна във вида на

характеристичните ивици за лекарството, може да се счита, че то физично присъства в структурите без да взаимодейства химично с полимерните матрици.

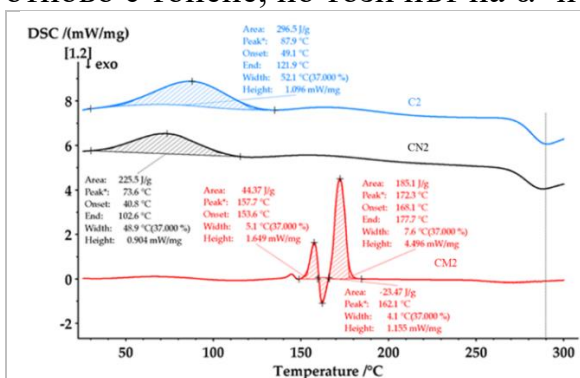


Фиг. IV.4.2.: ФТИР спектри на:
хитозанови частици (синьо),
хитозанови частици, омержени с
натриев полифосфат (зелено),
хитозанови частици с манитол
(червено)

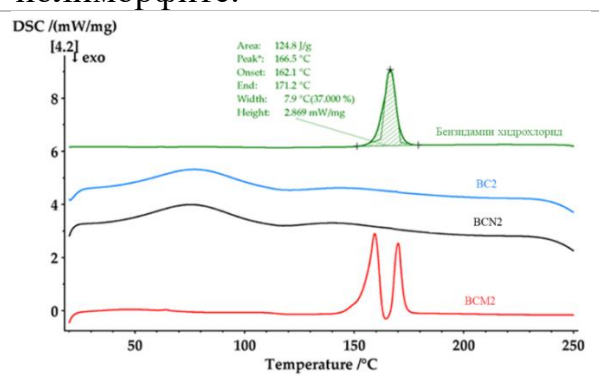


Фиг. IV.4.3.: ФТИР спектри на:
хитозанови частици с ВНСІ
(синьо), омержени хитозанови
частици с ВНСІ (зелено),
хитозанови частици с манитол и
ВНСІ (червено), чист ВНСІ (черно)

Термичната стабилност и фазовото състояние на образците са изследвани по метода на ДСК – фиг. IV.4.4. В термограмата на проба CM2 ясно се наблюдава наличието на два ендотермични и един екзотермичен преход. Първият е при 157,7 °C с енталпия 44,37 J/g и се дължи на топенето на δ -полиморфа на манитола. Последващ е прехода на кристализация при 162,1 °C и енталпия 23,47 J/g. Вторият ендотермичен преход е свързан отново с топене, но този път на α - и β -полиморфите.



Фиг. IV.4.4.: Термограми на:
хитозанови частици (синя линия);
хитозан с омержител (черна
линия); хитозан с манитол
(червена линия)

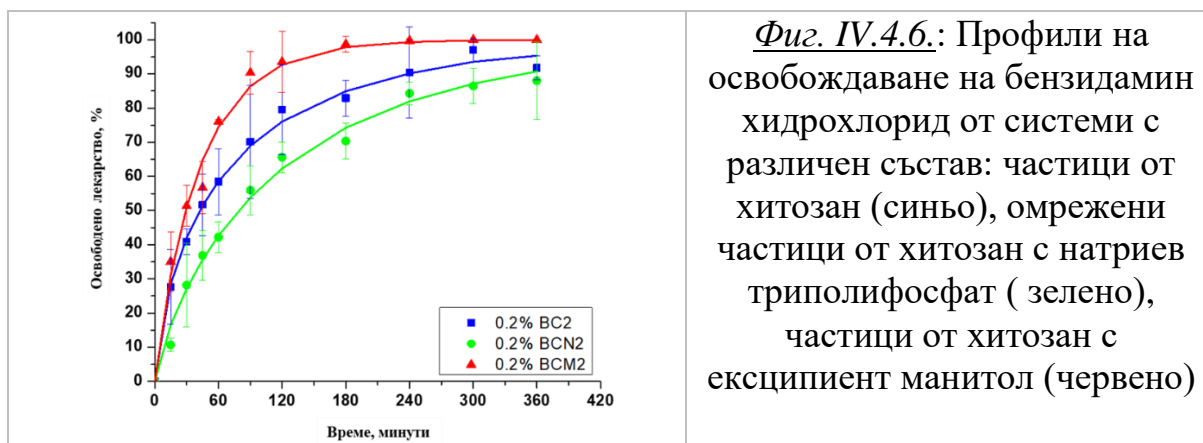


Фиг. IV.4.5.: Термограми на: чист
ВНСІ (зелена линия); хитозанови
частици с ВНСІ (синя линия);–
хитозан с омержител и бензидамин
(черна линия); хитозан с манитол и
бензидамин (червена линия)

Чистото лекарство се характеризира с тесен ендотермичен пик на 166,5 °C с енталпия 124,8 J/g, поради силно кристалната си структура – фиг.

IV.4.5. Липсата на пикове, съответстващи на лекарството, в пробите BC2 и BCN2, водят до извода, че то е преминало в аморфно състояние, като същото важи и за образец BCM2.

Кумулативното количество освободено лекарствено вещество от трите типа частици бе изследвано в буфер при рН 6,8 и температура $37,0 \pm 0,5$ °С – фиг. IV.4.6. Профилът на освобождаване на ВНС1 от всички системи е сходен и типичен за водоразтворимите лекарства – двуфазен с начален етап на бързо освобождаване, в този случай за около 120 минути, последван от забавено освобождаване на останалото вещество. Вероятно обяснение за това може да се потърси в процеса на формиране на частиците. Докато водата се изпарява от центъра към повърхността им, с нея мигрира и част разтвореното в нея лекарство, натрупвайки се приоритетно в периферията на частиците. Тази улеснена миграция се дължи на високата дифузност на бензидамина и следователно ниското му число на Пекле.



Най-бързо освобождават частиците с манитол, като при тях се наблюдава пълно освобождаване още в рамките на 300 минути. Въпреки значително по-големите си размери, при процеса на формиране на частицата, се получават пори и канали във вътрешността ѝ, което значително улеснява процеса на навлизане на водната среда и миграцията на лекарството. Частиците на база само хитозан, за 24 часа освобождават 93%, а тези с омрежител – 89%. Очаквано, добавянето на омрежител забавя процеса на освобождаване. Като оптимален модел за математично описание на поведението на получените частици, бе изведен този на Вайбул. Механизмът на освобождаване на лекарството от частици само от хитозан е единствено Фикова дифузия. В резултат на омрежването се отчита и промяна в механизма на освобождаване във Фикова дифузия, комбинирана с набъбване и релаксиране на веригите. В допълнение, омрежените частици са и с по-голям размер от неомрежените, което намалява контактната повърхност и забавя освобождаването. При частиците с манитол също се отчита комбиниран механизъм, поради наличието на пори и ускорената дифузия на водните молекули, обусловена от добрата разтворимост на ексципиента.

IV. 5. Формиране на казеинови частици, получени по метода на разпръсквателното сушене, при вариране на отношението полимер:лекарство

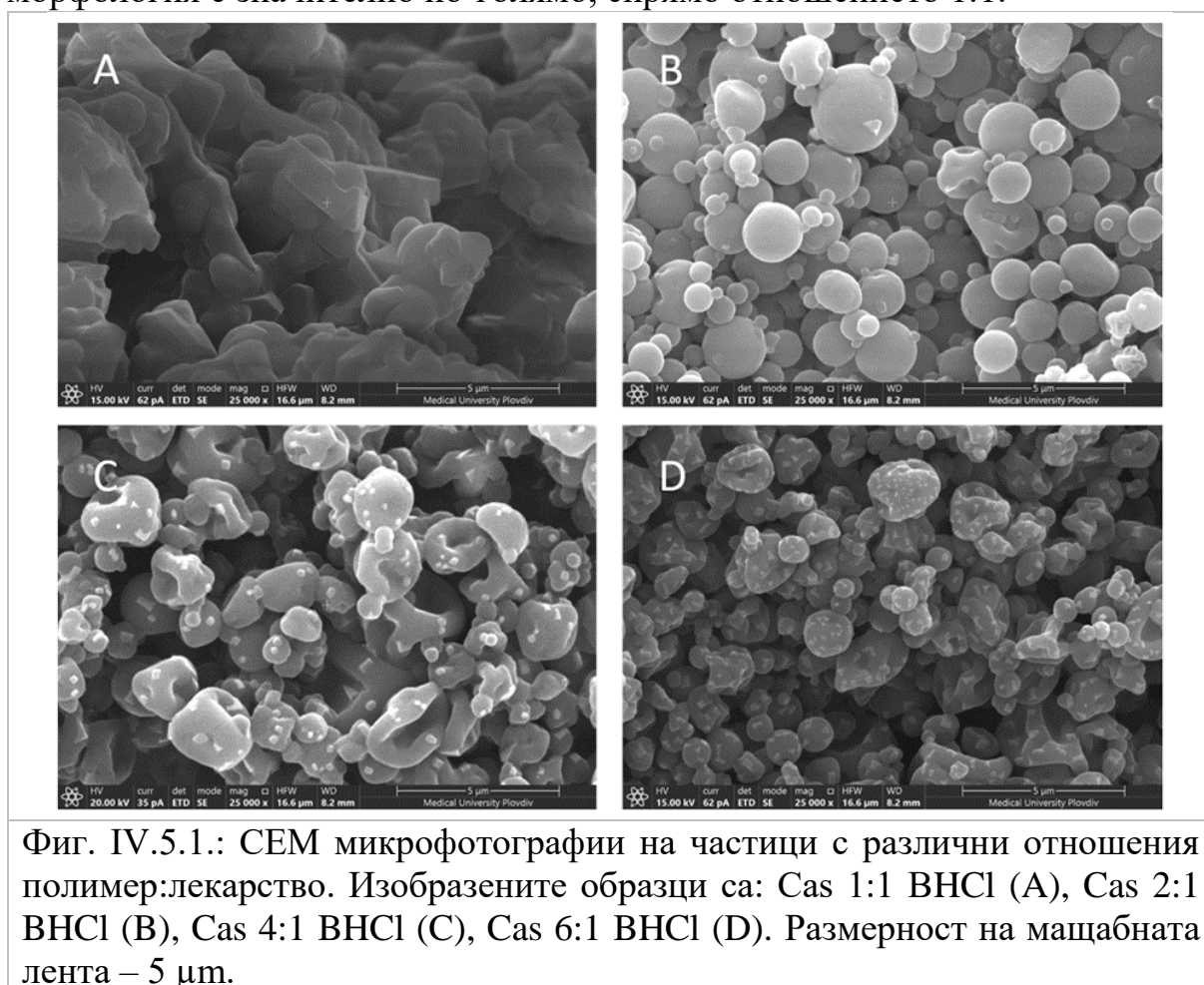
В настоящото изследване е представен потенциала на казеинови частици, получени по метода на разпръсквателно сушене от разтвори със силно кисело рН да включват и освобождават контролирано бензидамин хидрохлорид. На база на предварителни изследвания, е избрана конкретна система от частици, която е оптимална според стойностите за добив и размери (Zahariev, et al. 2021). Избраната структура за натоварване с лекарство е със състав: 1% концентрация на казеин и 1,5 М концентрация на калциевия дихлорид. Тази система се характеризира със средни размери от $(104,1 \pm 8,5)$ nm и добив $(64,80 \pm 3,02)$ %. Въпреки че при $\text{pH} \leq 4,6$ казеинът е положително зареден, в модела на Horne е отчетено, че калцият има стабилизиращо действие върху на мицелите (Horne, et al. 1998). Параметрите на разпрашените частици, натоварени с различни масови отношения между избрания полимер и моделното лекарство, са представени в таблица IV.5.1:

Таблица IV.5.1.: Размери, добив и ефективност на включване на казеиновите частици (n=3)

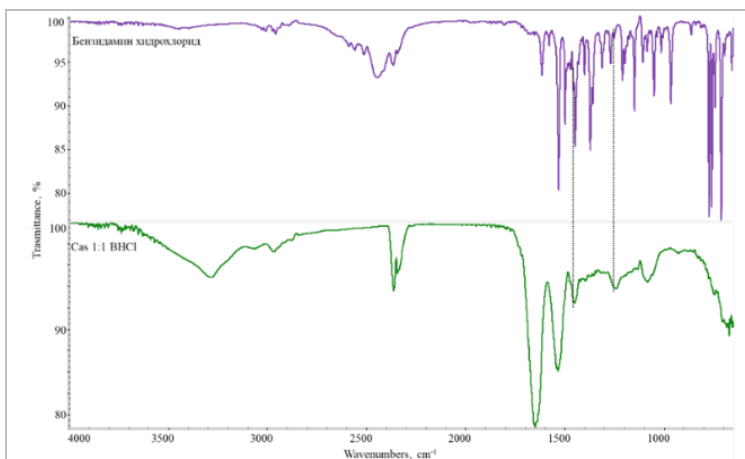
Образец	Размери \pm SD, nm	Добив \pm SD, %	ЕВ \pm SD, %
Cas 1:1 ВНСI	$994,2 \pm 2,2$	$30,42 \pm 4,28$	$34,61 \pm 0,23$
Cas 2:1 ВНСI	$243,6 \pm 2,5$	$74,71 \pm 5,41$	$78,82 \pm 0,39$
Cas 4:1 ВНСI	$159,8 \pm 2,4$	$68,76 \pm 5,01$	$76,23 \pm 0,28$
Cas 6:1 ВНСI	$135,9 \pm 1,7$	$58,23 \pm 5,08$	$77,44 \pm 0,57$

Размерите на получените структури са изследвани по метода на динамично светоразсейване и са в диапазона от 136 nm до почти 1 μm . За системата с масово отношение казеин:лекарство = 1:1 се наблюдава бимодално разпределение, вероятно поради значителна агрегация. Поради високото количество лекарство в разтвора се затруднява формирането на хомогенни структури със сходни размери и морфология, което повлиява негативно на добива, а следователно и на ефективността на включване, както е отбелязано и от Tran, et al. (2014). С повишаване на количеството казеин в общия разтвор, намалява и средния хидродинамичен радиус на структурите. Получените системи имат добив над 74%, с изключение на първото масово отношение 1:1, при което добивът е едва около 30%. Вероятна причина за поведението на този образец могат да са две явления: нарушаване на мицелната структура поради изместване на калциевия фосфат от тях, което води до формиране на преципитати още преди разтворът да бъде разпратен; и недостатъчна надкритична концентрация на полимера, за да формира стабилна структура (García, et al. 2020; Sinaga, et al. 2017). Увеличаването на количеството на полимера в общия разтвор леко повишава производствения добив, вероятно поради повишаването на

вискозитета и концентрацията на разтвора, въведен за разпръскване. Ефективността на включване отново е висока за всички разработени системи, освен за системата 1:1, като най-вероятно е повлиян от стойностите за добива. За нея, стойността за ефективността на включване е по-малка от 35%, като за другите типове частици варира от 76% до почти 79% с лека тенденция на нарастване при повишаване на количеството лекарство в общия разтвор. По-високите концентрации на казеина са по-способни да включат голямо количество бензидамин, вероятно заради по-интензивни хидрофобни взаимодействия, които са предпоставка за по-добра мицелна разтворимост на лекарството (Chen, et al. 2020). Хипотезата, обясняваща ниските добив и ефективност на включване за масово отношение 1:1, бе потвърдена след изследване на морфологията на четирите типа частици, посредством сканираща електронна микроскопия – фиг. IV.5.2. За образец 1:1 липсва ясно изразена морфология, доближаваща се дори до неправилна форма. Наличието на голямо количество лекарство в общия разтвор, затруднява формирането на плътна частица, както и стабилността на самите мицели. За отношенията казеин:лекарство 2:1, 4:1 и 6:1 формирането на частици с по-ниска степен на агрегация и по-малка кохезия с ясно изразена морфология е значително по-голямо, спрямо отношението 1:1.



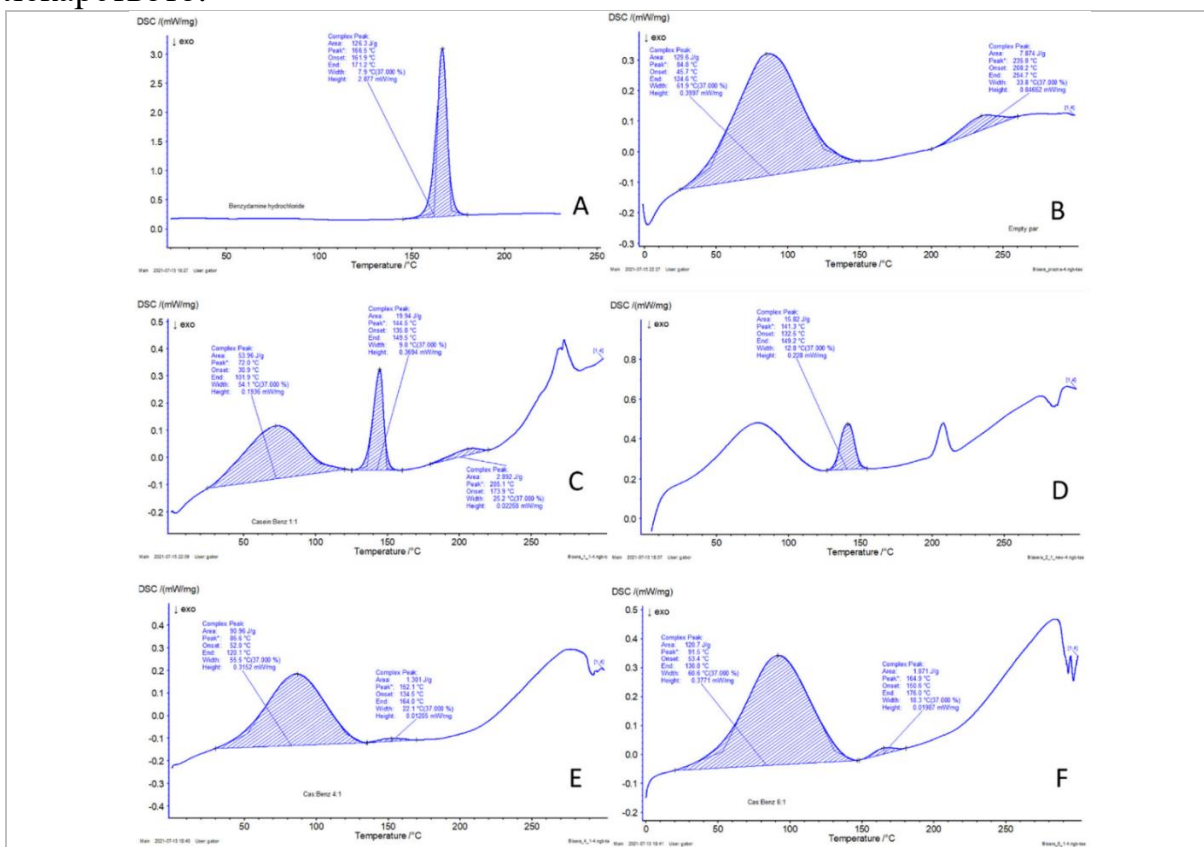
Фиг. IV.5.1.: СЕМ микрофотографии на частици с различни отношения полимер:лекарство. Изобразените образци са: Cas 1:1 VHCl (A), Cas 2:1 VHCl (B), Cas 4:1 VHCl (C), Cas 6:1 VHCl (D). Размерност на масштабната лента – 5 µm.



Фиг. IV.5.2.: Инфрочервени спектри на: чист ВНСI (лилаво), натоварени казеинови частици (зелено)

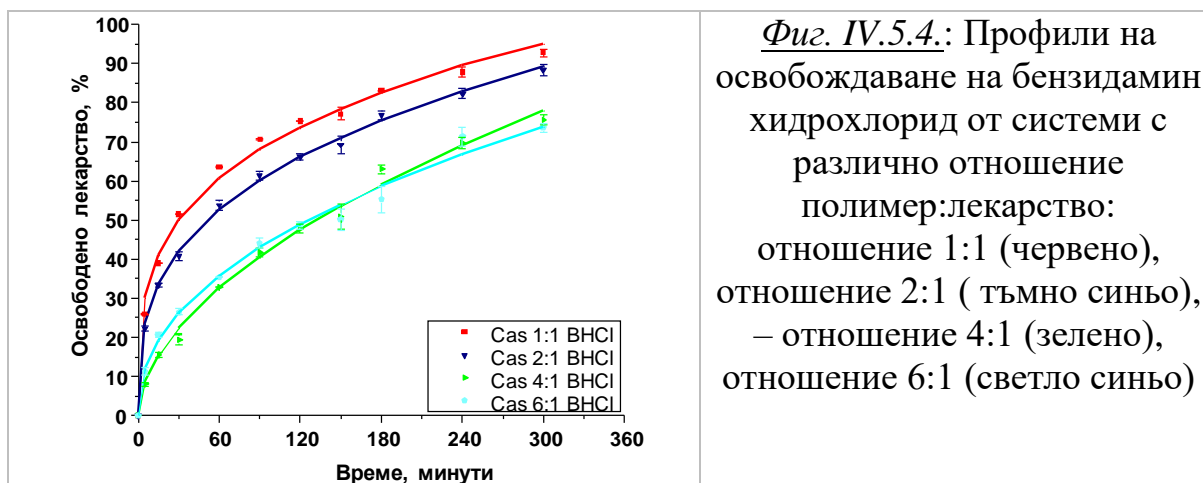
Спектрите на чистото вещество и натоварените с него частици, изследвани чрез ФТИР спектроскопия са представени на фигура IV.5.2. Поради липсата на отместване или промяна в характеристикните ивици на бензидамина, считаме че той е единствено физически захванат в частиците без да взаимодейства с казеина в силно киселинни условия.

На фиг. IV.5.3. са представени термограмите на празни казеинови частици, както и на всяко разработено отношение между полимера и лекарството.



Фиг. IV.5.3.: Термограми на чистото лекарствено вещество и различни типове частици: чист бензидамин хидрохлорид (A), празни казеинови частици (B), Cas 1:1 ВНСI (C), Cas 2:1 ВНСI (D), Cas 4:1 ВНСI (E), Cas 6:1 ВНСI (F)

За частиците, натоварени с лекарство, се появява втори ендотермичен пик за всички разработени системи. Той е свързан с топенето на бензидамина, поради наличието на фазов преход. Част от активното вещество е преминало в аморфна фаза. За системите частици с масови отношения 1:1 и 2:1 в полза на полимера, се наблюдава кристализация за близо 1/3 от масата на включеното лекарство, докато за другите две системи тя е около или под 13%. Най-ниска е стойността за системата с отношение 4:1, а именно 7%.



Фиг. IV.5.4.: Профили на освобождаване на бензидамин хидрохлорид от системи с различно отношение полимер:лекарство: отношение 1:1 (червено), отношение 2:1 (тъмно синьо), – отношение 4:1 (зелено), отношение 6:1 (светло синьо)

Профилите на освобождаване на четирите разработени системи (фиг. IV.5.4.) са изследвани за период от 5 часа при рН 6,8 и температура $37,0 \pm 0,5$ °C. За този период се наблюдава почти пълно освобождаване за системата с отношение 1:1. При системи 1:1 и 2:1 се отчита силно изразен „burst effect“, при който за първия час се освобождава над 50 % от включеното лекарство. Друг фактор, който влияе значително върху скоростта на освобождаване, може да е степента на рекристализация на лекарството. Забелязва се явна тенденция между отношението на вложеното лекарство в разтвора и количеството освободено в процеса на *in vitro* теста. Системите с отношение 4:1 и 6:1 освобождават накрая на периода почти еднакво количество, около 75 % от вложеното количество лекарство в тях. Това първоначално изпреварване може би се дължи на размерите на частиците и контактната повърхност между тях и акцепторната среда. Вероятно по-голямото количество полимер, вложено в разтвора на последните две системи, формира по-плътна мрежа, която затруднява миграцията на лекарството, въпреки по-голямата контактна повърхност спрямо системи 1:1 и 2:1.

На база коефициента на детерминация R^2 и разпределението на резидиумите, като оптимален модел, е изведен този на Корсмайер-Пепас. За най-бързо освобождаващите частици с масови отношения 1:1 и 2:1, стойността на n е по-малка от 0,45, което показва Фикова дифузия като транспортен механизъм. При останалите две системи стойността на $n > 0,45$, показвайки като основен механизъм нефикова дифузия (Das, et al. 2024).

V. ИЗВОДИ

1. При получаване на хитозанови частици по метода на йонотропното желиране с повишаване концентрациите на полимера и омрежителя се увеличават размерите, добива и ефективността на включване на активното вещество и се забавя процеса на освобождаване.
2. При получаване на частици на базата на казеин чрез йонотропно желиране се отчита нарастване на ефективността на включване и добива при увеличаване на концентрациите на полимера и омрежителя. В същото време повишаването на концентрацията на омрежителя води до намаляване на средните размери на частиците.
3. Промяната в стехиометрията на полиелектролитния комплекс казеин/хитозан води до оптимизиране на размера на получените частици (от 400 nm до 2 μ m) и до контролиране на скоростта на освобождаване на включения бензидамин хидрохлорид.
4. Използването на омрежител или ексципиент при разпръсквателно сушене на хитозанови частици позволява модулиране на размера им в диапазона 1-10 μ m и на тяхната морфология. В зависимост от състава на частицата, се отчита и разлика в механизма на освобождаване на бензидамин хидрохлорид.
5. Разпръсквателното сушене на подкислен казеинов разтвор в присъствието на различни концентрации на лекарство в него позволява формирането на частици с размери в субмикронния диапазон с относително висок добив (над 58%) и ефективност на включване на бензидамин хидрохлорида (около 80%). На база стойностите на моделните параметри, при излишък на полимер в масово отношение над 2:1, бензидаминът се освобождава чрез нефикова дифузия, докато при по-ниските отношения – посредством Фикова дифузия.
6. Механизмът и профилът на освобождаване на разработените системи частици, зависи не от метода на получаване, а от вида на полимера. За частиците на база полизахарид, оптималния модел за моделиране на процеса на освобождаване е Вайбул, а за тези на базата на протеин, както и полиелектролитния им комплекс – Корсмейер-Пепас.
7. На база добив, размери и количество включено лекарство като оптимален може да бъде изведен моделът частици от разпръснен казеин с масово отношение между полимера и лекарството 4:1.

VI. НАУЧНИ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

- Потвърден е потенциала на наночастици от хитозан, получени чрез йонотропно желиране в присъствието на натриев триполифосфат, да включват и контролирано да освобождават бензидамин хидрохлорид.

- За първи път са разработени и натоварени с бензидамин хидрохлорид казеинови частици по метода на йонотропното желиране в присъствието на алкохол и в киселинни рН условия.
- За първи път подробно е разгледано влиянието на стехиометричното отношение на полиелектролитен комплекс на база казеин-хитозан върху включването и освобождаването на бензидамин хидрохлорид.
- За първи път е оценено влиянието на омрежител или ексципиент в структури хитозан-бензидамин хидрохлорид, получени по метода на разпрашителното сушене.
- За първи път са получени и охарактеризирани натоварени с бензидамин хидрохлорид казеинови наночастици, получени чрез разпрашително сушене в киселинни условия в присъствието на калциеви йони и е установено влиянието на отношението полимер:лекарство върху основните физико-химични показатели на структурите.

VII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

Пълният литературен обзор, както и списък с цитираните литературни източници може да бъде намерен в дисертационния труд.

VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

СПИСЪК С НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА:

- 1) **Milenkova, S.**, Pilicheva, B., Uzunova, Y., Yovcheva, T., & Marudova, M. (2022). Casein Microgels as Benzydamine Hydrochloride Carriers for Prolonged Release. *Materials*, 15(4), 1333.

Индексирана в Scopus/Web of Science, Q2 (IF=3,4)

Цитирана в:

- Dai, C., Li, W., Zhang, C., Shen, X., Wan, Z., Deng, X., & Liu, F. (2024). Microcapsule delivery systems of functional substances for precision nutrition.
- Feitosa, M. L., da Silva Costa, D. V., Teixeira, I. M. M., SAMPAIO, T., Gaspar, D. M., Martins, A. M. C., ... & de Sousa, F. C. F. (2024). Benzydamine induces apoptosis in astrocytes in vitro. *Journal of Health & Biological Sciences*, 12(1), 1-7.
- Mao, T., Akshit, F. N. U., Matiwalage, I., Sasidharan, S., Alvarez, C. M., Wescombe, P., & Mohan, M. S. (2024). Preferential binding of polyphenols in blackcurrant extracts with milk proteins and the effects on the bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols. *Foods*, 13(4), 515.
- 2) Marudova, M., **Milenkova, S.**, Zahariev, N., Yovcheva, T., & Pilicheva, B. (2023). Formulation and characterization of Benzydamine loaded casein/chitosan nanocomplexes. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2436, No. 1, p. 012028). IOP Publishing.

Индексирана в Scopus, SJR=0,18

- 3) **Milenkova, S.**, Ambrus, R., Mukhtar, M., Pilicheva, B., & Marudova, M. (2024). Spray-Dried Chitosan Hydrogel Particles as a Potential Delivery System for Benzydamine Hydrochloride. *Gels*, 10(3), 189.

Индексирана в Scopus/Web of Science, Q1 (IF=4,6)

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ:

- 1) „Improved Nutraceutical Based Systems as Benzydamine Hydrochloride Carriers“ - Bucharest Polymer Conference 2nd Edition Held at the University POLITEHNICA of Bucharest, Romania 9-11 June 2021
- 2) "Formulation and characterization of Benzydamine loaded casein/chitosan nanocomplexes" -22nd International School on Condensed Matter Physics: State of the Art in Functional Materials & Technologies (ISCMP 2022) 28/08/2022 - 02/09/2022 Varna, Bulgaria;
- 3) “Chitosan-Casein complexes as carriers for bioactive compounds” - Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science 18-20 January 2023, Szeged, Hungary.
- 4) “Chitosan-based spray dried particles as delivery system for Benzydamine Hydrochloride” - 7th International Symposium Frontiers in Polymer Science 29 May- 1 June 2023, Gothenburg, Sweden
- 5) “Biopolymeric nano- and micro-sized hydrogel particles as an emerging tool for controlled release of senolytics” - BIOTECHNOLOGIES FOR PERSONALIZED MEDICINE, 31.10 -2.11 2023, Plovdiv, Bulgaria

УЧАСТИЯ В МОБИЛНОСТИ:

- 1) Специализация по проект ПЕРИМЕД (Център за компетентност „Персонализирана иновативна медицина“ (ПЕРИМЕД) по Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ BG05M2OP001-1.002-0005-C01) - 13.10.2022 г. до 11.11.2022 г. Приемаш университет: Факултет по фармация на Университета в Сегед, Унгария.
- 2) Краткосрочна докторантска мобилност по Еразъм - 16.01.2023г. до 15.02.2023г. Приемаш университет: Факултет по фармация на Университета в Сегед, Унгария.

УЧАСТИЯ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ И ИНФРАСТРУКТУРНИ ПРОЕКТИ:

- 1) „Нови микро- и наноструктурирани лекарствени системи за букална администрация“ КП-06-Н38/3 от 05.12.2019г. финансиран от Фонд Научни изследвания, Министерство на образованието и науката – млад учен.
- 2) Център за компетентност „Персонализирана иновативна медицина“ (ПЕРИМЕД) по Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ BG05M2OP001-1.002-0005-C01 от 30.03.2018г., финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2023 г. и съфинансиран от Европейския съюз чрез Европейския фонд за регионално развитие – млад изследовател.