

**Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет по Фармация**

Йоана Николова Сотирова

**Наноструктурни липидни носители с включен екстракт
от *Hypericum perforatum* L. за приложение върху кожата и
ускорено заздравяване на рани**

АВТОРЕФЕРАТ

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

**Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.3. Фармация
Научна специалност: Фармакология (вкл. фармакокинетика
и химиотерапия)**

Научни ръководители:

**Проф. Калоян Георгиев, д.ф.н.
Доц. Величка Андонова, д.ф.**

Варна, 2024 г.

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет на Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет „Фармация“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, състоял се на 29.11.2024 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Доц. Мая Петрова Радева-Илиева, д.ф., Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет по Фармация, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, Председател на Научното жури;
2. Доц. д-р Силвия Ганчева Маринова, д.м., Катедра „Фармакология и клинична фармакология и терапия“, Факултет по Медицина, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Външни членове:

3. Проф. Милен Венциславов Димитров, д.ф., Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“, Факултет по Фармация, Медицински университет – София;
4. Проф. Маргарита Иванова Трайкова, д.ф., Катедра „Фармацевтични науки“, Факултет по Фармация, Медицински университет – Пловдив;
5. Проф. Крум Стефанов Кафеджийски, д.ф., Катедра „Фармацевтични науки“, Медицински колеж, Тракийски университет – Стара Загора.

Резервни членове:

1. Доц. д-р Антоанета Борисова Георгиева, д.м., Катедра „Фармакология и клинична фармакология и терапия“ Факултет по Медицина, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна – вътрешен член;
2. Проф. д-р Людмил Пейчев Пейчев, д.м., м.з.м., Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет по Фармация, Медицински университет – Пловдив – външен член.

Дисертационният труд съдържа общо 123 страници, онагледен е с 38 фигури и 17 таблици. Библиографската справка включва 387 източника.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 14.02.2025 г. от 10.30 ч. в електронна среда чрез платформата Webex.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Съдържание

Използвани съкращения	5
I. Въведение	6
II. Цел и задачи	7
Цел	7
Задачи	7
III. Материали и методи	9
1. Използвани материали	9
1.1. Използвани субстанции и разтворители.....	9
1.2. Използван растителен материал.....	9
1.3. Използвани лабораторни и медицински консумативи, лекарствени продукти..	10
1.4. Използвани хранителни среди.....	10
1.5. Използвана аналитична апаратура и общолабораторно оборудване.....	10
1.6. Клетъчна линия.....	11
1.7. Култивиране на вирусен модел	11
1.8. Експериментални животни	11
2. Използвани методи.....	11
2.1. Приготвяне на екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин.....	11
2.2. Течнохроматографски анализ на получените екстракти от жълт кантарион	12
2.3. Приготвяне и охарактеризиране на наноструктурни липидни носители.....	12
2.4. Приготвяне и охарактеризиране на бигелове	17
2.5. <i>In vivo</i> проучване на ранозаздравяващия потенциал на изготвената крайна полутвърда лекарствена форма	19
2.6. Статистическа обработка на данните	20
IV. Резултати и дискусия	21
1. Получаване на екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин	21
1.1. Разработване на модифициран метод на мацерация на растителната субстанция с ограничено влияние на светлина и атмосферен кислород.....	21
1.2. Качествен и количествен анализ на съдържанието на хиперфорин в получените екстракти от жълт кантарион	22
2. Разработване и охарактеризиране на наноструктурни липидни носители, натоварени с екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин	23
2.1. Разработване на ненатоварени наноструктурни липидни носители чрез високоскоростна хомогенизация с последваща ултрасонификация при вариране на твърдите липиди, течните масла и експерименталните условия.....	23
2.2. Охарактеризиране на ненатоварените наноструктурни липидни носители	23

2.3. Охарактеризиране на наноносителите, натоварени с богат на хиперфорин екстракт от жълт кантарион.....	27
3. Разработване и охарактеризиране на полутвърда лекарствена форма (бифазен гел) с включени наноструктурни липидни носители, натоварени с богат на хиперфорин екстракт от жълт кантарион	35
3.1. Външен вид	35
3.2. Морфологични характеристики	36
3.3. рН	36
3.4. Физична стабилност	37
3.5. Механични свойства.....	37
3.6. Реологично поведение.....	39
4. <i>In vivo</i> проучване на ранозаздравяващия потенциал на изготвената крайна полутвърда лекарствена форма върху модел на ексцизионна рана при експериментални животни .	41
4.1. Проследяване в динамика на тъканното възстановяване по настъпилите с времето промени в размера на предизвиканите рани	41
4.2. Определяне на плазмен антиоксидантен статус	43
V. Изводи.....	45
VI. Приноси	47
VII. Списък с научни публикации и участия, свързани с дисертационния труд.....	48

Използвани съкращения

ПАВ	–	повърхностно активно/и вещество/а
ККИД50	–	клетъчно културална инфекциозна доза 50%
ABTS	–	2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)
ANOVA	–	дисперсионен анализ
АО	–	бадемово масло
ATR-FTIR	–	инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация в режим на пълно вътрешно отражение
ВО	–	масло от пореч
BW	–	бял пчелен восък
DLS	–	динамично светлоразсейване
DMEM	–	модифицирана Игъл среда на Дюлбеко
DMSO	–	диметилсулфоксид
ЕЕ	–	ефективност на натоварване
ELS	–	електрофоретично светлоразсейване
GB	–	глицерил бехенат
HP	–	хиперфорин
HPLC	–	високоэффективна течна хроматография
HSV-1	–	херпес симплекс вирус тип 1
MDA	–	малонов диалдехид
MDBK	–	Madin-Darby bovine kidney клетъчна линия
NLCs	–	наноструктурни липидни носители
PSMO	–	полиоксиетилен (20) сорбитан моноолеат
Rpm	–	обороти в минута
SD	–	стандартно отклонение
SMO	–	сорбитан моноолеат
TEM	–	трансмисионна електронна микроскопия
UV	–	ултравиолетова област на светлината
Vis	–	видима област на светлината

I. Въведение

Лечението на рани се оказва сериозен и широкомащабен проблем. Ранозаздравяването, само по себе си, представлява сложен и динамичен физиологичен процес. Върху неговото нормално протичане оказват влияние редица екзогенни и ендогенни фактори. Използваните понастоящем терапевтични средства и подходи, обаче, невинаги успяват навременно да балансират необходимата микросреда в увредената кожна тъкан. Това налага търсенето и въвеждането на нови лекарствени вещества с подобрена активност и широкоспектърно действие.

Жълтият кантарион (*Hypericum perforatum* L.) е лечебно растение, ползвано както в случаите на психични разстройства (депресия, тревожност и безсъние), така и в терапията на кожни патологични състояния, вкл. рани от различен произход. За споменатите и други фармакологични прояви на растението основна роля има наличното в него биологично активно вещество хиперфорин – съединение с изключително ниска химична стабилност. Последната се оказва съществено предизвикателство пред въвеждането му в дерматологичната практика.

Един от възможните начини за повишаване стабилността на хиперфорин е включването му в състава на подходяща лекарстводоставяща система. Измежду утвърдените наноразмерни носители, като пригодни за приложение върху кожата са изтъкнати т.нар. наноструктурни липидни носители. Този тип биосъвместими и биоразградими наночастици притежават и висок капацитет за лекарствено натоварване.

Немаловажен подход при разработването на наноструктурни липидни носители за дермално приложение е включването им в полутвърда лекарствена форма, която следва да увеличи контактното им време с кожата. Това неминуемо би довело и до повишена терапевтична ефективност. С високо ниво на пациентско одобрение са отличени бигелите. Освен че притежават благоприятна текстура и хидратиращи свойства, посочените бифазни носители проявяват и способността да оптимизират дермалното лекарствено доставяне.

В тази връзка, дисертационният труд разглежда възможността за включване на богат на хиперфорин екстракт от жълт кантарион в наноструктурни липидни носители като обща стратегия за ускорено заздравяване на рани.

II. Цел и задачи

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е разработване на наноструктурни липидни носители с включен екстракт от жълт кантарион, предназначени за дермално приложение и ускорено заздравяване на рани.

Задачи

За реализиране на дефинираната цел, бяха поставени следните задачи:

1. Получаване на екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин (НР).
 - 1.1. Разработване на модифициран метод на мацерация на растителната субстанция с ограничено влияние на светлина и атмосферен кислород.
 - 1.2. Качествен и количествен анализ на съдържанието на НР в получените екстракти от жълт кантарион.
2. Разработване и охарактеризиране на наноструктурни липидни носители (NLCs), натоварени с богат на НР екстракт от жълт кантарион.
 - 2.1. Разработване на ненатоварени NLCs чрез високоскоростна хомогенизация с последваща ултрасонификация при вариране на твърдите липиди (глицерил бехенат (GB), пчелен восък (BW)), течните масла (масло от пореч (BO), бадемово масло (AO)) и експерименталните условия (скорост на хомогенизиране, продължителност на ултразвуковата обработка, температура на ултрасонифициране).
 - 2.2. Охарактеризиране на ненатоварените NLCs по отношение на външен вид, среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал, степен на кристалност и физична стабилност. Избор на подходящи носители за включване на екстракт от жълт кантарион, богат на НР.
 - 2.3. Получаване на натоварени с богат на НР екстракт от жълт кантарион NLCs и охарактеризиране по отношение на външен вид, среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал, промени в полиморфните модификации, ефективност на натоварване, стабилност, *in vitro* антимикробна ефективност и антивирусно действие.
3. Разработване и охарактеризиране на полутвърда лекарствена форма (бифазен гел) с включени NLCs, натоварени с богат на НР екстракт от жълт кантарион.
 - 3.1. Получаване на ненатоварени бигелове с желиращи агенти полуксамер 407 и сорбитан моностеарат и бигелове, съдържащи NLCs с включен екстракт от жълт кантарион, богат на НР.
 - 3.2. Охарактеризиране на празните и натоварените бифазни гелове по отношение на външен вид, хомогенност, рН, физична стабилност, механични свойства (размазваемост, твърдост, адхезивност и кохезивност) и реологично поведение.

4. *In vivo* проучване на ранозаздравяващия потенциал на изготвената крайна полутвърда лекарствена форма върху модел на ексцизионна рана при експериментални животни.
 - 4.1. Проследяване в динамика на тъканното възстановяване по настъпилите с времето промени в размера на предизвиканите рани.
 - 4.2. Определяне на плазмен антиоксидантен статус (антиоксидантен капацитет и степен на оксидативен стрес).

III. Материали и методи

1. Използвани материали

1.1. Използвани субстанции и разтворители

- ♦ НР стандарт ($\geq 85\%$, HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- ♦ Екстракт от жълт кантарион, получен чрез суперкритична екстракция с въглероден диоксид (Flavex Naturextrakte GmbH, Rehlingen-Siersburg, Germany);
- ♦ Дихлорметан, безводен ($\geq 99,7\%$, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Ацетонитрил ($> 99,8\%$, HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Метанол, безводен ($\geq 99,9\%$, analytical grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Фосфорна киселина (HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ GB (Compritol® ATO 888, Gattefossé, Saint-Priest, France);
- ♦ BW (Chemax Pharma Ltd., Sofia, Bulgaria);
- ♦ АО (Alteya Organics, Stara Zagora, Bulgaria);
- ♦ БО (Alteya Organics, Stara Zagora, Bulgaria);
- ♦ Полиоксиетилен (20) сорбитан моноолеат (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- ♦ Сорбитан моноолеат (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Би-дестилирана вода (получена в лабораторни условия);
- ♦ HEPES буфер (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany);
- ♦ Фетален телешки серум (Gibco, Waltham, MA, USA);
- ♦ Пеницилин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany);
- ♦ Стрептомицин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany);
- ♦ Неутрално червено (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Ледена оцетна киселина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- ♦ Етанол, абсолютен ($\geq 99,9\%$, HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Фосфатно буфериран физиологичен разтвор (pH 7,4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Полоксамер 407 (Kolliphor® P407; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- ♦ Сорбитан моностеарат (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Ацикловир, 3 mM разтвор в DMSO (Deutsches Kresforschung Zentrum, Heidelberg);
- ♦ Метиленово синьо (Chemax Pharma Ltd., Sofia, Bulgaria);
- ♦ Диамониева сол на 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина) ($\sim 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Пикочна киселина ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Калиев персулфат (99,99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Фосфатен буфер (pH 7,4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Трихлороцетна киселина ($\geq 99,5\%$, Merck KGaA, Darmstadt, Germany);
- ♦ Тиобарбитурова киселина ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany);
- ♦ Малонов диалдехид ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

1.2. Използван растителен материал

- ♦ Жълт кантарион, стръкове (Bilek, Troyan, Bulgaria).

- 1.3. Използвани лабораторни и медицински консумативи, лекарствени продукти
- ♦ Шотов стъклен филтър с порьозност 4, 50 mL (Isolab, Hannover, Germany);
 - ♦ Сириндж филтри Minisart® RC25 (0,2 µm, d = 25,0 mm, Sartorius, Göttingen, Germany);
 - ♦ Виялки, 2 mL (amber glass, ND 8 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
 - ♦ Микроепруветки тип Епендорф, 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany);
 - ♦ Плаки за клетъчно култивиране Corning® Costar® (Corning, NY, USA);
 - ♦ Кетамин 5%, инжекционен разтвор (Bremer Pharma GmbH, Warburg, Germany);
 - ♦ Ксилазин 2%, инжекционен разтвор (Alfasan Int., Woerden, Netherlands);
 - ♦ Йодасептадон 10%, дермален разтвор (Chemax Pharma Ltd., Sofia, Bulgaria);
 - ♦ Физиологичен разтвор (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany).
- 1.4. Използвани хранителни среди
- ♦ Мюлер-Хинтон бульон (Ridacom, Sofia, Bulgaria);
 - ♦ Модифицирана Игъл среда на Дюлбеко (DMEM; Gibco, Waltham, MA USA).
- 1.5. Използвана аналитична апаратура и общолабораторно оборудване
- ♦ Аналитична везна Kern ABJ220-4NM с точност 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany);
 - ♦ Прецизна везна Kern PCB 1000-2 с точност 0,01 g (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany);
 - ♦ Дестилатор Gesellschaft für labortechnik mbH (Burgwedel, Germany);
 - ♦ Автоматични пипети Optipette (Corning HTL SA, Warsaw, Poland) – OP100 (10–100 µL), OP1000 (100–1000 µL) и OP5000 (50–5000 µL);
 - ♦ Високоэффективен течен хроматограф Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System (USA), снабден с автоматичен инжектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Autosampler, USA), кватернерна помпа (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 LPG-3400SD Quaternary Pump, USA), вариабилен UV/Vis детектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100 Variable Wavelength Detector/VWD, USA) и детектор на диодна матрица (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 DAD3000 Diode Array Detectors, USA);
 - ♦ Ротационен вакуум изпарител Hei-VAP Expert (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany);
 - ♦ Електромагнитна бъркалка IKA® RCT basic (IKA®-Werke, Staufen, Germany);
 - ♦ Високоскоростен хомогенизатор Ultra-Turrax® T25 (IKA®-Werke, Staufen, Germany);
 - ♦ Ултразвукова вана Advantage-Lab™ AL04-06 (Fisher Scientific GmbH, Vienna, Austria);
 - ♦ Зетасайзер Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK);
 - ♦ Дифрактометър Panalytical Empyrean diffractometer (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK);
 - ♦ Инфрочервен спектрофотометър Tensor II FT-IR (Bruker, Bremen, Germany);
 - ♦ Трансмисионен електронен микроскоп HRTEM JEOL JEM 2100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan);
 - ♦ Механична бъркалка IKA® EUROSTAR 60 digital (IKA®-Werke, Staufen, Germany);
 - ♦ Оптичен микроскоп Leica DM1000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), снабден с камера Leica ICC50W (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany);
 - ♦ Портативен рН метър pH 70 Vio (XS Instruments, Carpi, Italy);
 - ♦ Микроцентрифуга D2012 Plus (DLAB Scientific, Rowland St. City of Industry, CA, USA);

- ♦ Текстурометър Belle (Agrosta Overseas, Serqueux, France);
- ♦ Вискозиметър HAAKE™ Viscotester™ 550 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- ♦ Спектрофотометър M501 (single beam UV/Vis; Spectronic CamSpec Ltd., Leeds, UK);
- ♦ CO₂ инкубатор HERA cell 150 (Radobio Scientific Co., Ltd., Shanghai, China);
- ♦ Четец на микроплаки (Biotek Organon, West Chester, PA, USA).

1.6. Клетъчна линия

В проведените *in vitro* изследвания е използвана клетъчна линия Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), изолирана от говежди бъбрек (Национална банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури, София). Адхерентен неин монослой се култивира в растежна хранителна среда, съдържаща DMEM, 10% фетален телешки серум, 10 mM HEPES буфер, 100 IU/ mL пеницилин и 100 µg/mL стрептомицин. Инкубацията се провежда в инкубатор HERA cell 150 при 37 °C и 5% CO₂ атмосфера.

1.7. Култивиране на вирусен модел

Използваният херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1), щам Виктория, е получен от Национален център по заразни и паразитни болести, София. Вирусът се репликира в конфлуентен монослой от MDBK клетки (т. 1.6.). Като поддържаща хранителна среда е използвана DMEM с 0,5% фетален телешки серум, 100 IU/mL пеницилин и 100 µg/mL стрептомицин. След инкубиране при 37°C и 5% CO₂, вирусният добив се съхранява при -80 °C. Вирусното натоварване е определено като 10^{8,5} клетъчно културални инфекциозни дози 50% (ККИД50) в 1 mL.

1.8. Експериментални животни

Използвани са 119 мъжки плъха от порода Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) на средна възраст 100 дни и с телесно тегло 200÷250 g. Гризачите са предоставени от Вивариум към Медицински Университет – Варна. Отглеждани са поединично в пластмасови клетки (ширина 23 cm × дължина 42 cm × височина 14 cm) при стандартни условия: температура 22 ± 1 °C и относителна влажност 55 ± 10%. Поддържан е 12-часов цикъл на светлина/тъмнина. Осигурен е свободен достъп до стандартна гранулирана храна и чиста питейна вода. Преди началото на изследванията е проведена 10-дневна аклиматизация.

Експериментите са проведени след одобрение от Комисията по етика към животните при Българската агенция по безопасност на храните (разрешение № 265 от 02.06.2020 г.). Всички изследвания са в съгласие с Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22.09.2010 г. относно защитата на животните, базелската конвенция и етичните насоки за изследователите на Международния съвет за лабораторни науки за животни.

2. Използвани методи

2.1. Приготвяне на екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин

Екстрактът е получен посредством мацерация на растителния материал. За целта, 30,0 g стръкове от жълт кантарион се поставят в боросиликатен флакон от тъмно стъкло (с вместимост 250 mL). Като екстрагент е използван безводен дихлорметан (CH₂Cl₂). Мацерацията се провежда на тъмно след предварителна деаерация на разтворителя и растителната маса с аргон в продължение на 30 min. След 48 h, полученият извлек се филтрува

под вакуум през филтър от синтеровано боросиликатно стъкло. Използваният органичен разтворител се отстранява при понижено налягане с помощта на ротационен вакуум изпарител Hei VAP Expert. Полученият екстракт се съхранява при -20 °C.

Получени по този метод са два екстракта, различаващи се по вложеното съотношение растителна маса/разтворител – 30:75 и 30:100 (w/v; g/mL).

2.2. Течнохроматографски анализ на получените екстракти от жълт кантарион

2.2.1. Условия на течнохроматографския анализ

Анализът е извършен с помощта на високоефективен течен хроматограф Thermo Scientific UltiMate 3000, снабден с вариабилен UV/Vis-детектор. Разделянето се извършва с помощта на колона Thermo Scientific HYPERSIL GOLD AQ C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), защитена с предколона HYPERSIL GOLD AQ C18 (10 mm x 4,6 mm, 5 µm). Използваната подвижна фаза е в състав 0,3% фосфорна киселина–ацетонитрил в съотношение 10:90 (v/v). Анализът се провежда в изократен режим при скорост на подаване на подвижната фаза от 0,8 mL/min. Общото времетраене на протокола е 12 min. Температурата на хроматографската колона и автоматичния инжектор са поддържани съответно при 25 и 10 °C. Обемът на всяка от инжектираните проби е 20,0 µL. Съставът на елуента се установява посредством UV/Vis детекция при дължина на вълната 273 nm. Обработката на данни, както и контролът на системата по време на анализа, са извършени с помощта на специализиран софтуер Chromeleon™ (версия 7.2)¹.

2.2.2. Пробоподготовка

Екстрактите от жълт кантарион се разтварят в безводен метанол и се довеждат до концентрация 20,0 µg/mL със същия разтворител. Всяка проба се приготвя непосредствено преди анализа. Получените проби се филтруват през сириндж филтър (Minisart® RC25 0,20 µm) и се анализират шесткратно (съгласно представения в точка 2.2.1 хроматографски протокол)¹.

2.2.3. Качествен и количествен анализ на съдържанието на хиперфорин в получените екстракти от жълт кантарион

Присъствието на НР в получените екстракти е установено по показателя време на задържане. За идентификацията на анализа и неговия количествен анализ е използван метода на абсолютната калибровка. С последния е определен и екстракционният добив (концентрацията на НР в получените екстракти). За целите на анализа са използвани сертифициран стандарт на НР и търговски екстракт – продукт, получен посредством суперкритична екстракция с въглероден диоксид.

2.3. Приготвяне и охарактеризиране на наноструктурни липидни носители

2.3.1. Приготвяне на наноструктурните липидни носители

В състава на липидните наноносители са включени следните компоненти:

- Твърд липид:

¹ Stefanov, S., Stoeva, S., Georgieva, S., Hristova, M., Nikolova, K., Dobрева, M., Andonova, V. (2022) 'In vivo comparative assessment of incised wound healing in rats after application of hydrogel/organogel formulation containing St. John's wort methanol extract', Bulgarian Chemical Communications, 54, 46-51.

- Бял пчелен восък (BW);
- Глицерил бехенат (GB).
- Течен липид:
 - Бадемово масло (АО);
 - Масло от пореч (ВО).
- Повърхностно активни веществата (ПАВ):
 - Полиоксиетилен (20) сорбитан моноолеат (PSMO) и сорбитан моноолеат (SMO).

Концентрацията на липидната фаза в наночастиците е постоянна (10%, w/w) при съотношение между твърд и течен липид 7:3. В използваната 5% (w/w) смес от ПАВ, заложеното съотношение между PSMO и SMO е 3:2.

За получаването на NLCs са приложени последователно процесите емулгиране, високоскоростна хомогенизация (10 000 и 15 000 rpm) и ултрасонификация при 4 и 25 °C за 5 и 15 min. За целта, водната фаза (смес от би-дестилирана вода и PSMO) се загрява до 80 ± 2 °C и се прибавя на капки към нагрятата до същата температура липидна фаза (съставена от твърд, течен липид и SMO). Емулгирането се осъществява при непрекъснато разбъркване със скорост 750 rpm в продължение на 3 min с помощта на електромагнитна бъркалка (IKA® RCT basic). Получената макроемулсия се хомогенизира в продължение на 3 min с помощта на високоскоростен диспергатор (Ultra-Turrax® T25), а след това се ултрасонифицира в ултразвукова вана Advantage-Lab™ AL04-06.

Заредени с екстракт от жълт кантарион образци (HP-NLC) са получени чрез включване на извлека (1,25%, w/w) в липидната фаза на тъмно, преди етапа на емулгиране.

2.3.2. Охарактеризиране на наноструктурните липидни носители

2.3.2.1. Среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал

Средният размер, индексът на полидисперсност и зета потенциалът на разработените наночастици са измерени чрез методите на динамично (DLS) и електрофоретично (ELS) светлоразсейване. Всички дисперсии са разредени хилядократно с двойно дестилирана вода, за да се избегне т.нар. многократно разсейване. Посочените параметри са оценени с помощта на аналитичен инструмент Zetasizer Ultra, опериращ с хелиево-неонов лазер, доставящ вертикално поляризирана светлина с дължина на вълната 633 nm. За оценка на размерните характеристики на частиците са проведени трикратни измервания на интензитета на обратно светлоразсейване (при ъгъл от 173°). Повърхностният електричен товар е определен по светлоразсейването при ъгъл от 13°. Всички изследвания са проведени при 25 °C.

2.3.2.2. Степен на кристалност

Посредством рентгеноструктурен анализ е проследена промяната в степента на кристалност на следните проби:

- Твърди липиди;
- Липидни смеси на твърд и течен липид в съотношение 7:3, получени чрез хомогенизация след стапяне при 80 ± 2 °C;
- NLC носители;
- HP-NLC дисперсии;
- Екстракт от жълт кантарион, богат на HP.

Изследванията са извършени с помощта на рентгенов дифрактометър (Panalytical Empyrean Diffractometer), снабден с Cu-K α монохроматор ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Дифрактометрирането е проведено в интервал от ъгли на разсейване $2-50^\circ 2\theta$. Анализите са проведени при скорост на сканиране от 1 s/стъпка и размер на стъпката от $0,013^\circ 2\theta$.

2.3.2.3. Физична стабилност при съхранение

NLC дисперсиите са съхранявани при 4°C в продължение на шест месеца и са оценявани визуално, ежемесечно, за възможни прояви на физична нестабилност.

2.3.2.4. Ефективност на натоварване

За да се определи действителното съдържание на екстракт (респективно на НР) в липидните наноносители, е изследван параметърът ефективност на натоварване (ЕЕ). За целта, $1,00 \pm 0,01 \text{ g}$ от всеки НР-NLC образец се центрофугира при $10\,000 \text{ rpm}$ за 30 min . След отнемане на супернатанта, липидната фракция се диспергира в 10 mL безводен метанол. Всички така получени проби се разреждат петдесетократно с безводен метанол и филтруват през сиридж филтри (Minisart® RC25 $0,20 \mu\text{m}$). Присъствието на НР в тях се установява съгласно гореописания течнохроматографски протокол. ЕЕ се определя по следния начин²:

$$EE, \% = \frac{\text{практически установено количество НР (mg)}}{\text{теоретично заложено количество НР (mg)}} \times 100$$

2.3.2.5. Екстракт-липидни взаимодействия

За да се установи реалното взаимодействие между екстракта и липидните наноносители, е проведен ATR-FTIR анализ. В изследването са включени следните образци:

- Екстракт от жълт кантарион, богат на НР;
- NLC дисперсии;
- НР-NLC дисперсии, натоварени с $1,25\%$ (w/w) екстракт;
- НР-NLC дисперсии, натоварени с $2,50\%$ (w/w) екстракт;
- НР-NLC дисперсии, натоварени с $5,00\%$ (w/w) екстракт.

„Пренатоварените“ с екстракт носители (съдържащи $2,50$ и $5,00\%$ извлек) са приготвени аналогично на образците, заредени с $1,25\%$ екстракт. Всички наносуспензии са изследвани под формата на въздушносухи тънки филми, отложени върху предметни микроскопски стъкла.

ATR-FTIR спектри са снети с помощта на FTIR спектрофотометър (Tensor II) на основа проведени 32 скана. Спектрите са обработени със специализиран софтуер OPUS, версия 8.0. Анализите са проведени при постоянна температура от 21°C и ниска относителна влажност на въздуха.

2.3.2.6. Форма и вътрешна морфология

Формата, размерът и морфологията на „празните“ и заредени с екстракт наночастици са определени с помощта на трансмисионен електронен микроскоп (HRTEM JEOL JEM 2100), опериращ при напрежение на електронния лъч от 200 kV .

Пробоподготовка: всяка нанодисперсия се отлага върху покрита с въглерод медна решетка и се суши на въздух за 24 h .

² Younis, H., Khan, H.U., Maheen, S., Saadullah, M., Shah, S., Ahmad, N., Alshehri, S., Majrashi, M.A.A., Alsalmi, A., Siddique, R., Andleeb, M., Shabbir, S., Abbas, G. (2023) 'Fabrication, Characterization and Biomedical Evaluation of a Statistically Optimized Gelatin Scaffold Enriched with Co-Drugs Loaded into Controlled-Release Silica Nanoparticles', *Molecules*, 28(13), 5233.

2.3.2.7. Антивирусен ефект

2.3.2.7.1. Цитотоксичност

В изследването е използван конфлуентен MDBK монослой, култивиран в 96-ямкови плаки. Приготвят се серийни разреждания на NLC/HP-NLC образците в поддържаща DMEM среда. Всяка проба се накапва в четири ямки в обем от 0,1 mL. Плаките се инкубират при 37 °C и 5% CO₂ за 48 h. След микроскопска оценка, наносуспензиите се отстраняват. Влиянието им върху клетъчната жизнеспособност се определя чрез измерване степента на поглъщане на неутрално червено. За целта, клетките се инкубират с багрилото при 37 °C в продължение на 3 h, а след това се промиват с фосфатно буфериран физиологичен разтвор. Във всяка ямка се добавя по 0,15 mL десорбиращ разтвор (1% ледена оцетна киселина и 49% етанол в би-дестилирана вода). Трикратни измервания на оптичната плътност при $\lambda = 540 \text{ nm}$ се извършват в четец на микроплаки. Определят се цитотоксична концентрация 50% и максимално поносимата концентрация на всяка нанодисперсия. Стойностите се сравняват с данни, получени при провеждане на изследването с референтна субстанция (ацикловир).

2.3.2.7.2. Определяне на инфекциозен вирусен титър

Непосредствено преди анализите се приготвят десетократни падащи разреждания на вирусосъдържащия материал в DMEM среда. Експериментът се провежда в 96-ямкови плаки, като във всяка ямка се въвежда инокулум с обем 0,1 mL. С всяко вирусно разреждане се заразяват по четири ямки. След едночасова адсорбция, неадсорбираният вирус се отстранява и към всяка ямка се добавя по 0,1 mL DMEM среда. Плаките се инкубират при 37 °C и 5% CO₂ за 48 h. Инфекциозният вирусен титър се определя чрез микроскопска оценка на индуцирания цитопатичен ефект. Наблюденията се потвърждават чрез измерване степента на поглъщане на неутрално червено (методиката е описана в предходната точка). Развитието на цитопатичен ефект за всяко вирусно разреждане се изчислява по следния начин:

$$100 - \left[\left(\frac{a - b}{c} \right) \times 100 \right]$$

където с a е отбелязана средната оптична плътност за съответното вирусно разреждане, b е средната оптична плътност при максимален цитопатичен ефект³, а c представя средната оптична плътност на незаразени клетки (клетъчна контрола).

Вирусните титри са представени в логаритмични инфекциозни единици (logIU), измерени като ККИД₅₀/0,1 mL.

2.3.2.7.3. Ефект върху вирусната репликация

Антивирусната активност на NLC и HP-NLC образците е определена посредством теста за инхибиране на вирус-индуцирания цитопатичен ефект. Обем от 0,1 mL вирусосъдържащ материал с натоварване 100 ККИД₅₀ се накапва във всяка ямка на 96-ямкови плаки. След едночасова адсорбция, неадсорбираният вирус се отстранява и в ямките се въвежда съответната липидна наносуспензия⁴. Клетките се инкубират в продължение на 48 h при 37 °C и 5% CO₂. Цитопатичният ефект се определя по метода на поглъщане на неутрално червено

³ Контролната проба е получена чрез инокулиране на клетки с максимално концентрирана вирусна суспензия.

⁴ Предварително са приготвени десетократни падащи разреждания на всяка липидна нанодисперсия.

(т. 2.3.2.7.1 от „Материали и методи“). За да се оцени антивирусното действие на наносуспензиите, са заложили и следните контролни проби: вирусна (инокулирана с HSV-1) и контрола за токсичност (съдържаща само NLC/HP-NLC).

Потискането на цитопатичния ефект при всяка изследвана NLC/HP-NLC концентрация се изчислява според следното уравнение:

$$\% \text{цитопатичен ефект} = \frac{\text{оптична плътност}_{\text{тест проба}} - \text{оптична плътност}_{\text{вирусна контрола}}}{\text{оптична плътност}_{\text{контрола токсичност}} - \text{оптична плътност}_{\text{вирусна контрола}}} \times 100$$

Концентрацията на NLC/HP-NLC, при която се отчита 50% потискане на цитопатичния ефект в сравнение с вирусната контрола, се дефинира като инхибираща концентрация 50%. От съотношението на цитотоксична концентрация 50% и инхибираща концентрация 50% се определя индексът на селективност на всяка липидна наносуспензия.

Експериментът се провежда повторно с референтна субстанция (ацикловир) и получените данни се използват за сравнение.

2.3.2.7.4. Вирусоцидно действие

Приготвят се проби, съдържащи равни обеми вирусна суспензия (10^5 ККИД₅₀/mL) и съответния NLC/HP-NLC образец в максимално поносимата за него концентрация (изчислена според описаната в т. 2.3.2.7.1 от „Материали и методи“ методика). Пробите се съхраняват при стайна температура за различни интервали от време (15, 30, 60, 90 и 120 min). Остатъчното съдържание на инфекциозен вирус се определя чрез метода на крайното разреждане⁵. Вирусният титър в тестовите проби се сравнява с положителен стандарт (етанол 70%) и вирусна контрола⁶ и се определят разликите във вирусното натоварване ($\Delta \log$).

2.3.2.7.5. Влияние върху вирусната адсорбция

16-ямкови плаки предварително се охлаждат при 4 °C. Всеки от тестваните нанообразци в максимално поносимата си концентрация се накапва в по четири ямки. Едновременно се въвежда и вирусна суспензия в доза от 10^4 ККИД₅₀. Следва едночасово инкубиране при 4 °C. Ямките се промиват с фосфатно буфериран физиологичен разтвор през различни интервали от време (15, 30, 45 и 60 min) с цел отстраняване на наносуспензиите и неприкрепения вирус. След това клетките се покриват с поддържаща среда и се инкубират при 37 °C за 24 h. Вирусният товар във всяка проба се определя чрез метода на крайното разреждане след три цикъла замразяване-размразяване⁵. Получените стойности се сравняват с тези на вирусна контрола и се изчислява $\Delta \log$.

2.3.2.8. Антимикробна активност

Антибактериалната и противогъбична активност на NLC и HP-NLC образците е определена срещу *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) и *Candida albicans* (ATCC 10231). Направено е двойно падащо разреждане (от 1:2 до 1:256) на наносуспензиите в 1,0 mL Мюлер-Хинтон бульон. По този начин са получени HP-NLC проби с концентрации, еквивалентни на 6,25, 3,125, 1,5625, 0,7813, 0,3906, 0,1953, 0,0977 и 0,0488 mg/mL екстракт.

⁵ Reed, L.J., Muench, H. (1938) 'A simple method of estimating fifty percent endpoints', American Journal of Hygiene, 27, 493-497.

⁶ Контролата съдържа равни обеми вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда.

Пробите се инокулират с 0,1 mL стандартизирана с денситометър микробна култура (0,5 МакФарланд единици) и се инкубират в аеробни условия: за 24 h при 37 °C (бактериални щамове) или за 48 h при 35 °C (*C. albicans*).

Заложени са и контролни проби:

- Положителни – получени чрез смесване на 0,1 mL от всяка микробна суспензия с 1,0 mL Мюлер-Хинтон бульон;
- Отрицателни – получени при смесване на тестваните NLC/HP-NLC образци с Мюлер-Хинтон бульон в съотношение 1:1.

Минималните бактерицидни/фунгицидни концентрации се определят чрез посевка на обем от 1 бримка йозе от всяка проба върху кръвен агар. Така получените проби отново се инкубират при гореописаните условия. Най-ниската концентрация, при която бактериалният/гъбичният растеж е инхибиран до 99,9%, се съобщава като минимална бактерицидна/фунгицидна. Всички експерименти са проведени в три повторения.

2.4. Приготвяне и охарактеризиране на бигелове

2.4.1. Приготвяне на бигеловите

Съставните компоненти на бифазните гелове, хидрогел и олеогел, са приготвени поотделно.

За получаването на хидрогела като желиращ агент е използван полоксамер 407. Първоначално, полимерът се разтваря в двойно дестилирана вода в продължение на 24 h при $4 \pm 1^\circ\text{C}$. След това, така полученият разтвор (20%, w/w) се темперира при стайна температура ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) до формиране на гелна структура.

Органогелът е в състав масло от пореч и сорбитан моностеарат в съотношение 85:15. Приготвен е чрез разтваряне на желиращия агент в загрятата до $60 \pm 2^\circ\text{C}$ маслена база при умерено разбъркване (200 rpm) с помощта на електромагнитна бъркалка (IKA® RCT basic).

Крайната полутвърда форма е получена по следния начин: горещият олеогел се добавя на порции към хидрогела при непрекъснато разбъркване с механична бъркалка (IKA® EUROSTAR 60 digital) при 1000 rpm за 10 min. Приготвени са четири „празни“ бигела (BG) с различно хидрогел-олеогелно съдържание: BG1 (90:10), BG2 (80:20), BG3 (70:30) и BG4 (60:40).

По аналогична методика и с аналогичен хидрогел-олеогелен състав са приготвени и HP-NLC-съдържащи бигелове (HP-NLC-BG1, HP-NLC-BG2, HP-NLC-BG3 и HP-NLC-BG4). Избраната HP-NLC дисперсия е включена в хидрогелната основа преди разтваряне на полимера и желиране. Концентрацията на екстракт в така получените бигели е 0,5% (w/w).

2.4.2. Охарактеризиране на бигеловите

2.4.2.1. Външен вид

Качествените характеристики на получените бигелове (цвят, мирис, хомогенност и консистенция) са оценени органолептично. Образуването на полутвърда структура е доказано по метода на обърнатата епруветка⁷.

⁷ Martín-Illana, A., Notario-Pérez, F., Cazorla-Luna, R., Ruiz-Caro, R., Bonferoni, M.C., Tamayo, A., Veiga, M.D. (2022) 'Bigels as drug delivery systems: From their components to their applications', *Drug Discovery Today*, 27(4), 1008-1026.

2.4.2.2. Морфологични характеристики

Морфологичните особености на двуфазните гелове са наблюдавани с помощта на оптичен микроскоп (Leica DM1000). За целта, точно претеглено количество от всеки бигел се разрежда с 10-процентен воден разтвор на метиленово синьо до концентрация 0,5% (w/w). За да се получат хомогенни емулсии, дисперсиите са ултрасонифицирани за 5 min. Проби от всяка така получена дисперсия (10 μ L) се накапват върху микроскопско предметно стъкло и се наблюдават при 40-кратно увеличение. Изображенията са снети с помощта на камера (Leica ICC50W) и обработени със софтуер Leica Application Suite, версия 3.4.0.

2.4.2.3. pH

Стойностите на pH на получените полутвърди форми са определени потенциометрично с помощта на портативен pH метър (pH 70 Vio). Всеки бигел е анализиран под формата на 10% (w/w) водна дисперсия. Проведени са трикратни измервания при температура 25 ± 1 °C.

2.4.2.4. Физична стабилност

Физичната стабилност на бигеловите е тествана с помощта на микроцентрифуга (D2012 Plus). В този случай, $1,0 \pm 0,1$ g от всеки образец се поставя в центрофужна епруветка (тип „Епендорф“) с обем 2 mL. Проведени са два последователни цикъла на центрофугиране: при 4000 rpm за 10 min и при 5000 rpm за същото време. Всички изследвания са осъществени при температура 25 ± 1 °C⁸.

2.4.2.5. Размазваемост

Размазваемостта на полутвърдите форми е определена по метода на паралелните плочи⁹. За целта, $1,0 \pm 0,1$ g от всеки бигел се притиска за 1 min между две стъклени плочи, едната от които (горната) е с маса 125,0 g. Резултатите от трикратно проведения анализ са представени в mm и отразяват съответния среден диаметър на размазване.

2.4.2.6. Твърдост, кохезивност и адхезивност

Механичните свойства на двуфазните състави са изследвани с текстурометър (Belle), оборудван с цилиндрично бутало с диаметър 18 mm. Твърдостта, кохезивността и адхезивността на бигеловите са оценени в режим на едноосна деформация на натиск при предварително зададено натоварване 5 kg. Използвани са постоянни предварителна и деформационна скорости от 3 mm/s. Зададената дълбочина на проникване е 5 mm. Измерванията са проведени в три повторения.

2.4.2.7. Реологично поведение

Реологичното поведение на бигеловите е определено с помощта на вискозиметър (HAAKE™ Viscotester™ 550) при температура 20 ± 1 °C. Всяка проба е трикратно изследвана в коаксиален цилиндричен сензор SV DIN при различни скорости на срязване (от 0,0123 до 1000 s⁻¹). За оценка на основните реологични параметри са използвани три различни модела

⁸ Cervera-Khelifi, C., Saada, M., Hayouni, E.A., Tourette, A., Bouajila, J., Ksouri, R. (2020) ‘Development and Characterization of Novel Bigel-Based 1,4-Naphthoquinones for Topical Application with Antioxidant Potential’, Arabian Journal of Science and Engineering, 45(1), 53-61.

⁹ Bashkurina, E.O., Anurova, M.O., Zavalniy, M.S., Demina, N.B., Bardakov, A.I., Krasnyuk I.I. (2022) ‘Dermatologic gels spreadability measuring methods comparative study’, Internation Journal of Applied Pharmaceutics, 14(1), 164-168.

(Таблица 1). Математическото моделиране е извършено в приложния софтуер на инструмента (OS550).

Таблица 1. Математически модели, приложени за изчисляване реологичните показатели на бигеловите¹⁰.

Модел	Математическо уравнение
Вископластичен модел на Бингам	$\tau = \tau_0 + \eta_p \times \gamma$
Степенен модел на Оствалд де Вееле	$\tau = K \times \gamma^n$
Модел на Хершел-Бълкли	$\tau = \tau_0 + K \times \gamma^n$

Легенда: τ , тангенциално напрежение; τ_0 , граница на течене; γ , скорост на деформация; η_p , пластичен вискозитет; K , коефициент на консистенция; n , индекс на течене.

2.5. *In vivo* проучване на ранозаздравяващия потенциал на изготвената крайна полутвърда лекарствена форма

От общия брой експериментални животни, седем са използвани като контролна група без ексцизионни рани (Група 0; G0).

Останалите гризачи са анестезирани с кетамин 5% и ксилазин 2%, приложени интрамускулно в доза от 35,0 mg/kg и 5,0 mg/kg, съответно. След асептична подготовка на кожата, в горната част на гърба на всеки плъх са създадени две ексцизионни рани с пълна дебелина посредством пънч с диаметър 6 mm. Раните са оставени отворени и са почиствани ежедневно с физиологичен разтвор.

Гризачите са разпределени в групи по двадесет и осем, както следва:

- Група 1 (отрицателна контролна група; G1) – нетретирани плъхове;
- Група 2 (положителна контролна група; G2) – гризачи, третирани с търговски продукт (крем) с ранозаздравяващ ефект¹¹;
- Група 3 (опитна група; G3) – животни, третирани с бигел, съдържащ екстракт от жълт кантарион, богат на НР¹²;
- Група 4 (опитна група; G4) – животни, третирани с бигел, съдържащ НР-NLC.

2.5.1. Проследяване на ранозаздравителен процес

Ранозаздравителният процес е проследен в четири времеви интервала: дву-, седем-, четиринадесет- и двадесет и един-дневен. Във всеки един период са включени по седем животни от всяка група. В групи 2, 3 и 4, съответната полутвърда форма е апликирана локално веднъж дневно, в рамките на заложените изследователски периоди. Всяка ранева област е фотографирана. Промените в размерите на раните са проследени и сравнени.

2.5.2. Определяне на антиоксидантен статус

Антиоксидантният статус на експерименталните животни е оценен в края на всеки от посочените четири ранозаздравителни периода. За целта, след предварителна анестезия с кетамин и ксилазин, е взета кръвна проба от плъщата югуларна вена и са проведени следните анализи:

¹⁰ Leusheva, E., Brovkina, N., Morenov, V. (2021) 'Investigation of Non-Linear Rheological Characteristics of Barite-Free Drilling Fluids', Fluids, 6, 327.

¹¹ Използваната полутвърда лекарствена форма съдържа екстракти от алое (*Aloe vera* (L.) Burm.f.), сладък бадем (*Prunus amygdalus* Batsch), ниргунди (*Vitex negundo* L.) и манджиста (*Rubia cordifolia* L.).

¹² Бигелът е приготвен по описаната в точка 2.4.1 на „Материали и методи“ методика и съдържа 80% хидрогел и 20% олеогел. Екстрактът от жълт кантарион (0,5%, w/w) е включен в маслената база на олеогела преди желиране.

2.5.2.1. Антиоксидантен капацитет

Плазменият антиоксидантен капацитет е определен посредством ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина) метод¹³, както следва: точно определен обем кръвна плазма (10 µL) се смесва с 1 mL разтвор на ABTS⁺¹⁴ във фосфатен буфер с pH = 7,4. Абсорбируемостта на използваното багрило се определя непосредствено преди и 6 min след добавяне на плазмата с помощта на спектрофотометър (M501) при дължина на вълната 734 nm. Като празна проба е използван фосфатен буфер. Нетната абсорбция (A) на всяка проба се изчислява съгласно следното уравнение:

$$A = [(A_{\text{проба 0 min}} - A_{\text{проба 6 min}}) - (A_{\text{празна проба 0 min}} - A_{\text{празна проба 6 min}})]$$

където с $A_{\text{(проба 0 min)}}$ и $A_{\text{(проба 6 min)}}$ са отбелязани измерените абсорбции на пробата преди и 6 min след началото на анализа, а с $A_{\text{(празна проба 0 min)}}$ и $A_{\text{(празна проба 6 min)}}$ – съответните стойности, отчетени при празната проба.

Количественият анализ е проведен по метода на абсолютната калибровка. В качеството на стандарт е използвана пикочна киселина. Данните, получени след трикратно измерване на всяка серия, са използвани за построяване на калибровъчна графика.

Плазменият антиоксидантен капацитет е представен като mmol/L еквиваленти пикочна киселина (UAE). Всяка проба е анализирана трикратно.

2.5.2.2. Степен на оксидативен стрес

Степента на оксидативен стрес е оценена посредством измерване плазмената концентрация на малонов диалдехид (MDA)¹⁵. За целта, аликвоти от 100 µL плазмен материал се смесват с 250 µL трихлороцетна киселина. Образуваната в резултат протеинова утайка се отстранява, а към супернатанта се добавят 150 µL тиобарбитурова киселина. Получените проби се нагряват при 96 °C за 20 min, а след това се охлаждат до стайна температура. Оптичната им плътност се измерва с помощта на спектрофотометър при $\lambda = 532 \text{ nm}$. В качеството на празна проба се използва тиобарбитурова киселина.

За целите на количествения анализ е използван метода на външния стандарт. Плазмената концентрация на MDA е изразена в nmol/L като средна стойност от три измервания.

2.6. Статистическа обработка на данните

Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на специализиран софтуер – SPSS, версия 26.0. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). Отклоненията между средните стойности са оценени посредством дисперсионен анализ (ANOVA) при p -стойност, по-малка от 0,05. Последващото им сравняване е осъществено посредством тест на Дънкан/ t -тест на Стюдънт.

¹³ Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', Free Radical Biology and Medicine, 26(9-10), 1231-1237.

¹⁴ Монокатионът е получен посредством взаимодействие между диамониева сол на 2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина) и калиев персулфат.

¹⁵ Porter, N.A., Nixon, J., Isaac, R. (1976) 'Cyclic peroxides and the thiobarbituric assay', Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism, 441(3), 506-512.

IV. Резултати и дискусия

1. Получаване на екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин

За получаването на екстракт от жълт кантарион с високо съдържание на НР беше приложен методът на мацерация. Екстракционна техника обикновено се използва за изолиране на термолабилни фитосъединения, какъвто се явява и прицелният флороглюцинол.

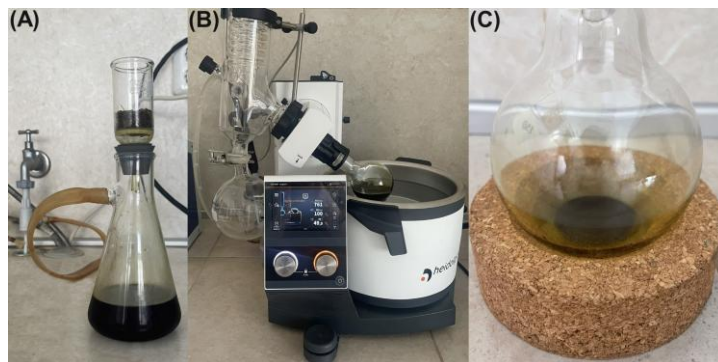
1.1. Разработване на модифициран метод на мацерация на растителната субстанция с ограничено влияние на светлина и атмосферен кислород

Предвид фотонестабилността на НР, както и високата му реактивност спрямо кислород, класическият вариант на мацерация беше допълнително модифициран. За да се ограничи влиянието на светлината, извличането беше проведено на тъмно, в боросиликатна реактивна банка от тъмно стъкло. С цел отстраняване на наличния атмосферен кислород от мацерационната среда беше извършен допълнителен етап на „дегазиране“ с аргон – мярка, която също следва да предотврати деструкцията на извлечения НР (Фигура 1).



Фигура 1. Експериментална постановка, използвана за получаването на екстракт от жълт кантарион, богат на НР.

След изтичане на мацерационното време, извлекът беше подложен на последващо филтруване, а използваният органичен разтворител (безводен дихлорметан) беше отстранен при понижено налягане (Фигура 2 (А) и (В)). За да се намали консумацията на разтворител и времето за последващата му дестилация, бяха предварително заложили много близки солватомодули¹⁶ – 1:2,5 и 1:3,33 (w/v). Получените екстракти представляват гъстовискозни, тъмнозелени маси (Фигура 2 (С)).



Фигура 2. Използвана експериментална постановка за филтруване на мацерата под вакуум (А) и отстраняване на разтворителя при понижено налягане (В). Крайният продукт (екстракт от жълт кантарион, богат на НР), е представен на подфигура (С).

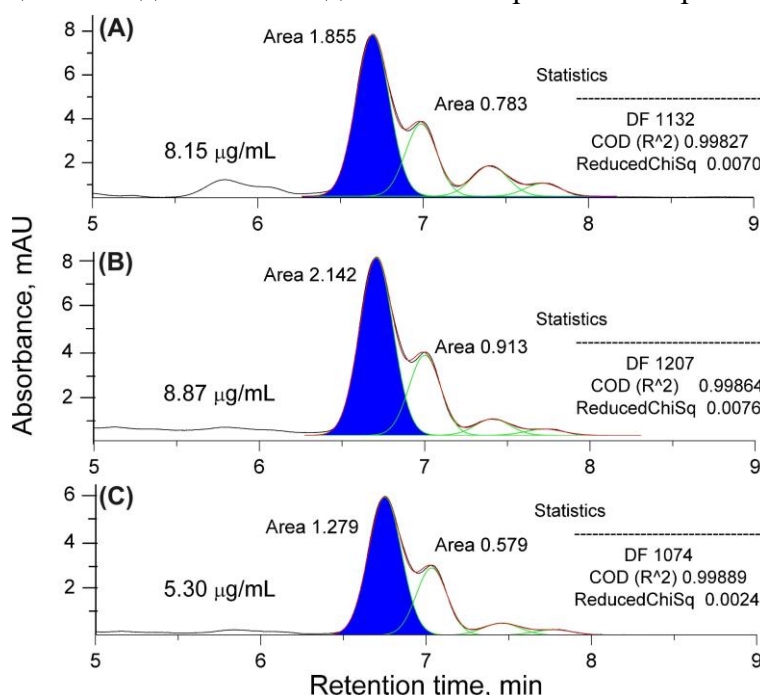
¹⁶ Съотношение между растителна субстанция и неводен екстрагент.

1.2. Качествен и количествен анализ на съдържанието на хиперфорин в получените екстракти от жълт кантарион

За целите на качествения и количествения анализ на НР в получените екстракти от жълт кантарион беше приложен валидиран HPLC-UV протокол¹. Хроматографският метод демонстрира отлична линейна зависимост на аналитичния сигнал от концентрацията на изследвания аналит (в концентрационния обхват от 1,0 до 50,0 $\mu\text{g/mL}$). За високата чувствителност на протокола свидетелства границата на количествено определяне на НР от 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ¹.

Изследвано беше влиянието на солватомодула върху екстракционния добив. Пригодността на приложената техника на извличане беше количествено оценена чрез сравнение с търговски екстракт, получен по метода на суперкритична екстракция с въглероден диоксид. Последният беше ползван в качеството на еталонна проба предвид високото съдържание на НР (40,1%) в него (Фигура 3).

Установена беше висока концентрация на НР и в двата екстракта, получени посредством мацерация ($> 5,0 \mu\text{g/mL}$; Фигура 3 (B) и (C)). От представените хроматограми е видно и влиянието на заложения солватомодул: с увеличаване количеството на използвания екстрагент нараства и концентрацията на търсения флороглюцинол – от 5,30 на 8,87 $\mu\text{g/mL}$. По отношение на екстракционния добив, постигнат при съотношение растителна маса:извличител 1:3,33, може да се каже, че качеството на получения екстракт е съпоставимо с това на изследвания търговски продукт (Фигура 3 (A) и (B)). По тази причина, той беше избран като образец за изследване в последвалата експериментална работа.



Фигура 3. Сравнителен HPLC анализ на търговски екстракт от жълт кантарион, богат на НР (A), екстракт, получен чрез мацерация при солватомодул 1:3,33 (B), и екстракт, получен чрез мацерация при солватомодул 1:2,5 (C). Сложно-съставните хроматографски пикове са разложени и представени в зелено, а площта на значимите (НР) пикове е запълнена в синьо. В червено са представени суперпозициите на зелено оцветените ивици. Степента на съвпадение на последните с реалните хроматограми е оценена статистически и получените резултати са представени във всяка подфигура.

2. Разработване и охарактеризиране на наноструктурни липидни носители, натоварени с екстракт от жълт кантарион, богат на хиперфорин

2.1. Разработване на ненатоварени наноструктурни липидни носители чрез високоскоростна хомогенизация с последваща ултрасонификация при вариране на твърдите липиди, течните масла и експерименталните условия

С цел оценка влиянието на състава и експерименталните условия върху характеристиките на получените ненатоварени наночастици, са разработени двадесет различни образца (Таблица 2).

Таблица 2. Състав на NLC образци и технологични параметри при приготвянето им.

Образец	Липидна фаза, 10% (w/w)				ПАВ, 5% (w/w)		Водна фаза, 85% (w/w)	Скорост на хомогенизация, rpm	Продължителност на ултрасонификация, min	Температура на ултразвуковата вана, °C
	Твърд липид (%w/w)		Течен липид (%w/w)		SMO (%w/w)	PSMO (%w/w)	Би-дестилирана вода (%w/w)			
	BW	GB	AO	BO						
NLC1	7		3		2	3	85	10 000	15	25 ± 1
NLC2	7			3	2	3	85	10 000	15	25 ± 1
NLC3		7	3		2	3	85	10 000	15	25 ± 1
NLC4		7		3	2	3	85	10 000	15	25 ± 1
NLC5	7		3		2	3	85	10 000	15	4 ± 1
NLC6	7			3	2	3	85	10 000	15	4 ± 1
NLC7		7	3		2	3	85	10 000	15	4 ± 1
NLC8		7		3	2	3	85	10 000	15	4 ± 1
NLC9	7		3		2	3	85	10 000	5	25 ± 1
NLC10	7			3	2	3	85	10 000	5	25 ± 1
NLC11		7	3		2	3	85	10 000	5	25 ± 1
NLC12		7		3	2	3	85	10 000	5	25 ± 1
NLC13	7		3		2	3	85	10 000	5	4 ± 1
NLC14	7			3	2	3	85	10 000	5	4 ± 1
NLC15		7	3		2	3	85	10 000	5	4 ± 1
NLC16		7		3	2	3	85	10 000	5	4 ± 1
NLC17	7		3		2	3	85	15 000	-	-
NLC18	7			3	2	3	85	15 000	-	-
NLC19		7	3		2	3	85	15 000	-	-
NLC20		7		3	2	3	85	15 000	-	-

2.2. Охарактеризиране на ненатоварените наноструктурни липидни носители

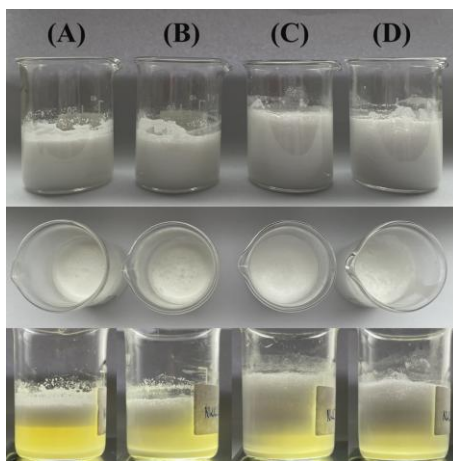
2.2.2. Външен вид

На външен вид, всички получени дисперсии са бели, млекоподобни течности. За да бъде представена тази тяхна качествена характеристика, един от образците (NLC1) беше фотографирен в прозрачен флакон (Фигура 4).



Фигура 4. Външен вид на NLC1 нанодисперсия.

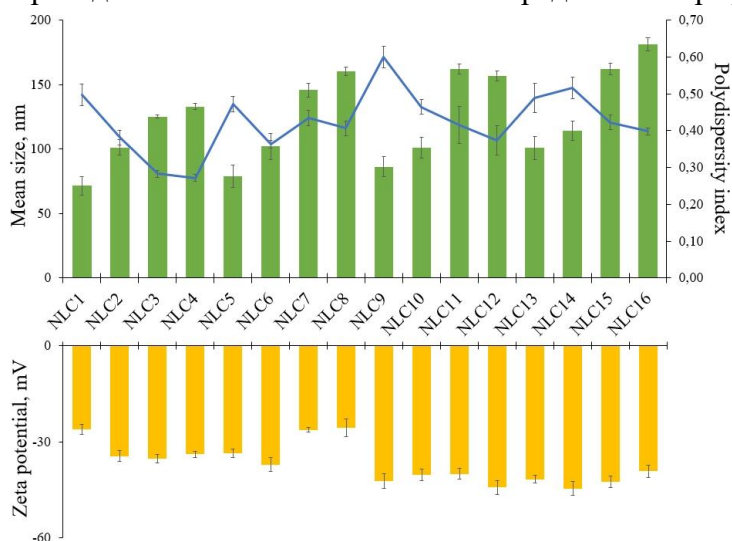
Образците, приготвени при по-високи обороти на хомогенизиране (15 000 rpm) се отличават по наличието на значително количество пяна (Фигура 5). При формирането ѝ, молекулите на включените ПАВ се ангажират в процеса на намаляване напрежението на фазовата граница въздух/течност. При тези условия, образуването около липидните наночастици сърфактантен филм следва да бъде по-тънък. Сама по себе си, недостатъчната му плътност може да доведе до физична нестабилност: коалесценция или фазово разделяне на NLC дисперсиите. По тази причина, липидните наносуспензии, приготвени при 15 000 rpm, бяха изключени от изследването.



Фигура 5. Външен вид на проби NLC17 (A), NLC18 (B), NLC19 (C) и NLC20 (D).

2.2.3. Среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал

Резултатите от проведените DLS и ELS анализи са представени графично на Фигура 6.



Фигура 6. Среден размер, индекс на полидисперсност и зета потенциал на NLC образците. На диаграмата са представени осреднените от трикратни измервания резултати и SD.

2.2.3.1. Среден размер на частиците

Във всички липидни нанодисперсии беше установено присъствието на частици със среден размер, по-малък от 200 nm (Фигура 6). Отчетено беше и влиянието на експерименталните условия (продължителност и температура на ултрасонификация) върху средния хидродинамичен диаметър. Единствено продължителността на ултразвуковата обработка оказва ефект върху дименсиите на частиците: по-кратката ултрасонификация води до получаване на по-големи по размер частици.

Видно е, че наноносителите, съдържащи глицерил бехенат, са по-големи от восък-базираните частици, независимо от температурата и продължителността на ултрасонификация, приложени за тяхното получаване. Тази разлика може да бъде отнесена до характерните температурни интервали на топене на глицерида (65–77 °C) и пчелния восък (62–64 °C). По-високотопимият липид определя образуването на по-вискозна маслена фаза, което води, от своя страна, и до формирането на по-големи по размер частици.

2.2.3.2. Индекс на полидисперсност

Получените нанодисперсии, с изключение на NLC9 и NLC14, показват индекс на полидисперсност, равен или по-малък от 0,5, а стойности, по-ниски от 0,3, бяха отчетени единствено при проби 3 и 4 (Фигура 6). Изразено въздействие върху изследвания параметър оказва само ултрасонификационната продължителност – по-краткото ултразвуково въздействие води до по-разнородно разпределение на частиците по размер.

2.2.3.3. Зета потенциал

Изследваните наноразмерни образци притежават стойности на електрокинетичен потенциал в интервала от $-25,64 \pm 2,7$ до $-44,58 \pm 2,20$ mV (Фигура 6). Според представената от Agedoke и Park класификация¹⁷, всички липидни наносуспензии се характеризират с висока стабилност, с изключение на умерено стабилните NLC1, NLC7 и NLC8. Въпреки това, използваните нейонни ПАВ упражняват и ефект на стерично отблъскване – в този случай, необходимият минимален зета потенциал достига стойност от ± 20 mV. Следователно се очаква и гореспоменатите образци да притежават относително висока физична стабилност.

Ефектът на ултрасонификационната продължителност е отново водещ: наблюдават се по-високи абсолютни стойности на зета потенциал при по-кратко приложение на ултразвук. Увеличението вероятно се дължи на формирането на по-големи частици, тъй като промяната в размера е обвързана с изменение в плътността на повърхностния сърфактантен филм.

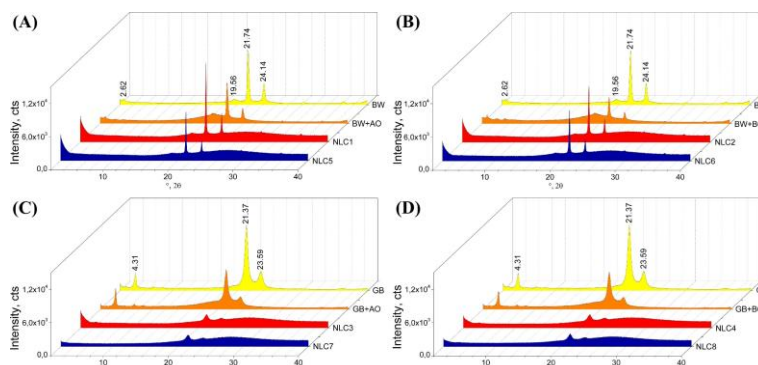
Резултатите от проведеното изследване на среден размер, индекс на полидисперсност и зета потенциал показват, че по-краткото ултразвуково приложение води до получаване на липидни дисперсии с по-големи частици и мултимодално разпределение по размер. Поради това, осем от образците (NLC9–NLC16) бяха изключени от изследването.

¹⁷ Нанодисперсиите могат да бъдат класифицирани като силно нестабилни ($\pm 0 \div 10$ mV), относително стабилни ($\pm 10 \div 20$ mV), умерено стабилни ($\pm 20 \div 30$ mV) и много стабилни ($> \pm 30$ mV).

Agedoke, O., Park, E. Y. (2016) 'Gold Nanoparticle-Quantum Dot Fluorescent Nanohybrid: Application for Localized Surface Plasmon Resonance-induced Molecular Beacon Ultrasensitive DNA Detection', Nanoscale Research Letters, 11, 523.

2.2.4. Степен на кристалност

Дифракционните профили на изходните твърди липиди, техни смеси с използваните растителни масла (приготвени в съотношение 7:3 чрез хомогенизация след стапяне при 80 ± 2 °C) и NLC дисперсиите са представени на Фигура 7.



Фигура 7. Рентгенови дифрактограми на твърди липиди (BW и GB), липидни стопилки на твърд и течен липид (BW+AO, BW+BO, GB+AO и GB+BO) и NLC суспензии (NLC1–NLC8). Образците са разпределени в подфигурите според вида на използваните липиди: BW и AO (A); BW и BO (B); GB и AO (C); GB и BO (D).

Площта под кривата в рентгенограмите на различните аналити е оцветена по следния начин: твърди липиди – жълто; липидни стопилки – оранжево; NLC носители, получени при 25 °C – червено; NLC проби, получени при 4 °C – синьо.

В рентгенограмата на BW присъстват четири значими рефлексии. Нискоинтензивните дифракционни линии при ъгли на разсейване $2\theta = 2,62^\circ$ ($d = 3,37$ nm) и $19,56^\circ$ ($d = 0,45$ nm) са присъщи за моноклинната структура на съдържащите се диестери и триклинно-орторомбичните полиморфни форми. Дифракционните максимуми, отчетени при $2\theta = 21,74^\circ$ ($d = 0,41$ nm) и $24,14^\circ$ ($d = 0,37$ nm) съответстват на орторомбичните въглеводородни и моноестерни (β' полиморфи) кристални фази.

В дифрактограмата на GB присъстват три основни рефлекса, характерни за неговата орторомбична β' полиморфна форма: при дифракционни ъгли $2\theta = 4,31^\circ$ ($d = 2,05$ nm), $21,37^\circ$ ($d = 0,42$ nm) и $23,59^\circ$ ($d = 0,38$ nm).

Отчетените характерни за BW и GB пикове се откриват в рентгенограмите на липидните стопилки и NLC образците с идентични d -разстояния. Непроменената позиция на дифракционните максимуми свидетелства за отсъствието на полиморфни трансформации в хода на експериментите.

Внасянето на течен липид предизвиква редукция в степента на кристалност на твърдите липиди: интензитетът на всички гореспоменати рефлексии е осезаемо по-нисък и в двете липидни стопилки. Същата тенденция, обаче, се наблюдава само в GB-съдържащите наночастици и свидетелства за „по-неподредената“ им структура. Освен това, не се установява и значима разлика между дифрактограмите на проби NLC3 и NLC7, както и между тези на NLC4 и NLC8: следователно, промените в ултрасонификационната температура не предизвикват полиморфни преходи в техните кристални фази.

2.2.5. Физична стабилност при съхранение

След едномесечно съхранение при 4 °C, образците, съдържащи BW, демонстрират фазово разделяне (Фигура 8). При последните се наблюдава и желиране след шест месеца при посочените условия.



Фигура 8. Външен вид на NLC дисперсиите веднага след приготвяне (A) и след едномесечно съхранение при 4 °C (B). Желирането при BW-базираните системи е представено на подфигура (C).

Тъй като при рентгеноструктурните изследвания не бяха установени промени в полиморфната модификация на съдържащия се восък, е възможно желирането на тези системи да се дължи на недостатъчната им еднородност. Известно е, че колоидните системи с разнородно разпределени по размер частици са „по-склонни“ към агрегация, а това вероятно „подпомага“ и образуването на здрави междучастичкови контакти. Предвид необходимостта от физична стабилност, BW-базираните NLC образци бяха изключени от проучването.

Изводи: Установено бе влиянието на експерименталните условия върху стабилността и физикохимичните характеристики на предложените NLC състави:

- Скорост на хомогенизиране – по-високата скорост на хомогенизиране предизвиква физична нестабилност в липидните наноносители;
- Продължителност на ултразвукова обработка – по-кратката ултрасонификация води до получаване на полидисперсни наносистеми, характеризиращи се с по-голям среден диаметър на частиците;
- Температура на ултрасонифициране – различният температурен режим на ултразвукова обработка не оказва влияние върху изследваните характеристики.

На база получените резултати, само два от първоначално заложените образци бяха определени като оптимални, а именно NLC3 и NLC4. Допълнителни анализи след натоварване с избрания екстракт бяха проведени единствено с тях.

2.3. Охарактеризиране на наноносителите, натоварени с богат на хиперфорин екстракт от жълт кантарион

2.3.1. Външен вид

Непосредствено след тяхното приготвяне, натоварените с богат на HP екстракт от жълт кантарион нанодисперсии (HP-NLCs) бяха опаковани във флакони от тъмно стъкло.

И двете изготвени HP-NLC проби притежават характерния за екстракта зелен цвят. За да бъде представена тази тяхна качествена характеристика, един от образците (HP-NLC3) беше фотографирен в прозрачен флакон (Фигура 9). Физичната стабилност на нанодисперсиите беше проследена визуално в рамките на едногодишно съхранение при 4 °C. В хода на наблюдение, те запазиха първоначалния си външен вид и не демонстрираха макроскопски признаци на физична нестабилност.



Фигура 9. Външен вид на HP-NLC3 нанодисперсия.

2.3.2. Среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал

Физикохимичните характеристики на натоварените наноносители (среден размер, разпределение по размер и зета потенциал) бяха проследени за период от една година. Изследвания са проведени непосредствено след приготвяне и след едно-, шест- и дванадесет-месечно съхранение при 4 °C (Таблица 3).

Таблица 3. Среден размер, индекс на полидисперсност и зета потенциал на натоварените с екстракт NLC системи (HP-NLC). Изложени в таблицата са осреднените от трикратни измервания стойности $\pm$ SD.

Образец	Ден	Среден размер, nm	Индекс на полидисперсност	Зета потенциал, mV
HP-NLC3	0	$142,97 \pm 2,00^c$	$0,25 \pm 0,01^d$	$-36,53 \pm 3,02^{a,b}$
	30	$212,17 \pm 2,76^a$	$0,43 \pm 0,02^a$	$-39,55 \pm 3,24^{a,b,c}$
	180	$206,93 \pm 4,18^a$	$0,45 \pm 0,02^a$	$-39,96 \pm 1,67^{b,c}$
	365	$209,37 \pm 3,32^a$	$0,44 \pm 0,01^a$	$-43,10 \pm 1,20^c$
HP-NLC4	0	$146,00 \pm 3,24^c$	$0,28 \pm 0,02^c$	$-36,22 \pm 1,68^a$
	30	$181,13 \pm 3,65^b$	$0,34 \pm 0,03^b$	$-42,22 \pm 1,36^c$
	180	$180,17 \pm 1,00^b$	$0,31 \pm 0,03^{b,c}$	$-39,93 \pm 0,65^{b,c}$
	365	$174,50 \pm 6,52^b$	$0,29 \pm 0,01^c$	$-38,09 \pm 0,81^{a,b}$

Легенда: Средните стойности във всяка колона, маркирани с еднакви буквени индекси, са статистически неразличими ($p < 0,05$).

2.3.2.1. Среден размер на частиците

Установеният среден размер на частиците и в двата образца попада в нано-областта – под 250 nm (Таблица 3). Релевантни разлики между средните диаметри не бяха установени единствено при проведения първи анализ в ден 0. С течение на времето, размерите на частиците в двата образца постепенно нарастват. При това, увеличаването на средния диаметър на HP-NLC3 носителите е значително по-осезаемо.

2.3.2.2. Индекс на полидисперсност

И двете нанодисперсии демонстрират относително хомогенно разпределение на частиците по размер. Свидетелство за това са индексите им на полидисперсност, които запазват своята стойност по-малка от 0,5 (Таблица 3).

Първоначално, в HP-NLC3 беше установена значимо по-ниска стойност на изследвания параметър. Още след първия месец от нейното съхранение, в системата се наблюдава нарастване на индекса на полидисперсност. В HP-NLC4 не беше отчетена значителна промяна в разпределението на частиците по размер. Наред с това, с изключение на данните, получени

в ден 0, дисперсността на HP-NLC4 остава значително по-ниска през целия едногодишен период.

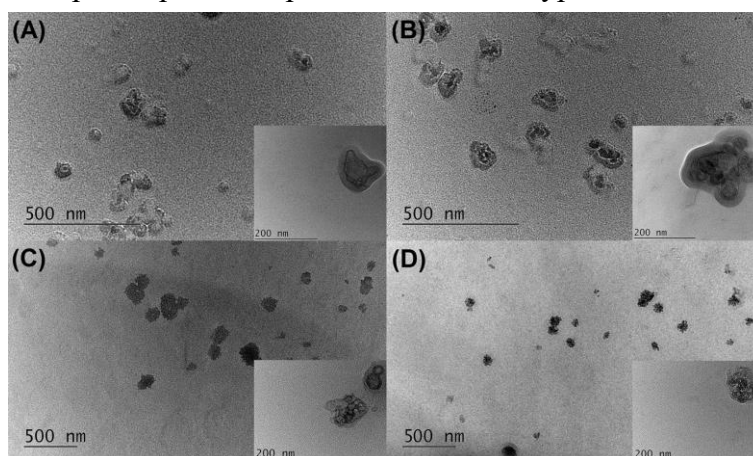
2.3.2.3. Зета потенциал

Частиците на изследваните липидни наносуспензии притежават зета потенциал, по-висок от $|30 \text{ mV}|$ (Таблица 3). Стойностите на повърхностния заряд и при двата образца се запазват високи в продължение на една година и предсказват добра физична стабилност.

Наблюдава се нарастване в абсолютната стойност на повърхностния заряд на наночастиците в хода на тяхното съхранение. Като причина за това вероятно отново може да се изтъкне връзката между средния хидродинамичен диаметър и зета потенциала. С увеличаване размера на носителите намалява заеманата от тях обща повърхностна площ, а съфактантната обвивка около всяка частица същевременно нараства.

2.3.3. Форма и вътрешна морфология

Формата, размерът и вътрешната морфология на получените наночастици беше изследвана посредством ТЕМ. За да се установи дали екстракта влияе върху тези техни характеристики, в електрон-микроскопското изследване бяха включени и „празните“ образци. Микрографиите на четирите проби са представени на Фигура 10.

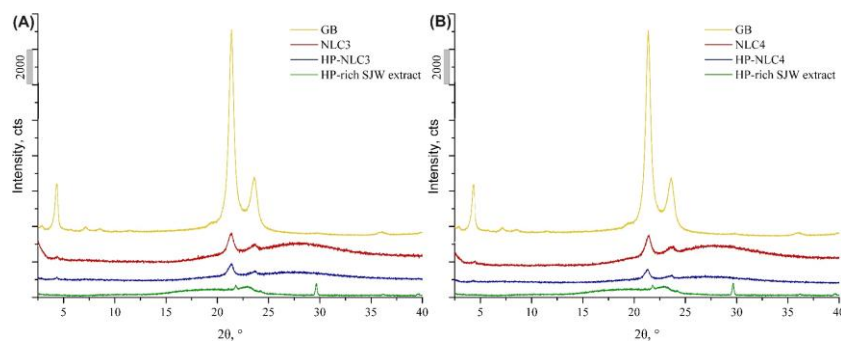


Фигура 10. ТЕМ изображения на NLC3 (A), HP-NLC3 (B), NLC4 (C) и HP-NLC4 (D).

Резултатите от ТЕМ анализа потвърждават отчетения и представен в т. 2.3.2.1 от раздел „Резултати и дискусия“ среден хидродинамичен диаметър на частиците. В микрографиите на всички образци се отчита присъствието предимно на частици с неправилна форма и ясно изразени ядро и обвивка. Според своята морфология, и четирите изследвани системи могат да бъдат причислени към NLC с несъвършена кристална матрица. Видно е, че ясно очертаната двуслойна структура на наноносителите е „по-аморфна“ в присъствието на растителния екстракт. Въпреки това, енкапсулирането не повлиява нито организацията на матрикса, нито тяхната цялост.

2.3.4. Степен на кристалност

Дифрактограмите на GB, NLC и HP-NLC дисперсиите, както и тази на богатия на HP екстракт от жълт кантарион, са представени на Фигура 11.



Фигура 11. Рентгенограми на GB, “празни” наночастици (NLC3 и NLC4), натоварени наноносители (HP-NLC3 и HP-NLC4) и екстракт от жълт кантарион, богат на HP (HP-rich SJW extract). Образците са разделени в две подфигури според вида на използваното масло: АО (А) и ВО (В). Ивиците на анализите са оцветени по следния начин: GB – жълто; NLC дисперсии – червено; HP-NLC системи – синьо; екстракт от жълт кантарион, богат на HP – зелено.

В рентгенограмите на натоварените наночастици, съвсем очаквано, се наблюдава присъствието на характерните за твърдия липид рефлексии (при 4,31, 21,37 и 23,59°), но с интензитет, значително по-нисък от този на GB и NLC образци. Следователно, може да се твърди, че включването на екстракта в наноносителите се съпровожда с понижение в степента на кристалност (аморфизация) на твърдия липид. В подкрепа на това твърдение свидетелстват и получените от ТЕМ анализа данни.

В HP-NLC дисперсиите се запазва присъщата за използвания глицерид β' кристална структура. Отсъствието на полиморфни изменения в NLC системите има важно значение, тъй като присъствието им може да бъде предпоставка за рязкото освобождаване на включеното в тях активно вещество. Съгласно данните от проведените изследвания, не се очаква бърза експулсия на включения екстракт от наноносителите.

В дифрактограмата на екстракта от жълт кантарион се наблюдават два рефлекса – при 21,80 и 29,65°. Последните не се откриват в дифрактограмите на HP-NLC дисперсиите. Причината за отсъствието им вероятно е аморфното или молекулно диспергираното състояние на екстракта в липидната матрица на наночастиците.

2.3.5. Ефективност на натоварване

За да бъде установено съдържанието на екстракт от жълт кантарион във всеки нанообразец, беше определена неговата ЕЕ (%). Параметърът беше количествено оценен по присъстващия HP. Трикратни измервания бяха извършени веднага след приготвянето на нанодисперсиите, както и на първия, шестия и дванадесетия месец от тяхното съхранение.

Двата образца демонстрират успешно енкапсулиране на екстракта. Доказателство за това е относително високото съдържание на HP в тях (> 70% от начално вложеното) (Таблица 4). Предвид изразената химична нестабилност на флороглуцинола, очаквано, количеството му в наноносителите намалява в хода на тяхното съхранение. Въпреки това, данните от проведените изследвания сочат, че HP-NLC4 показва по-висока ЕЕ и по-добра способност за стабилизиране на включения в тях богат на HP екстракт.

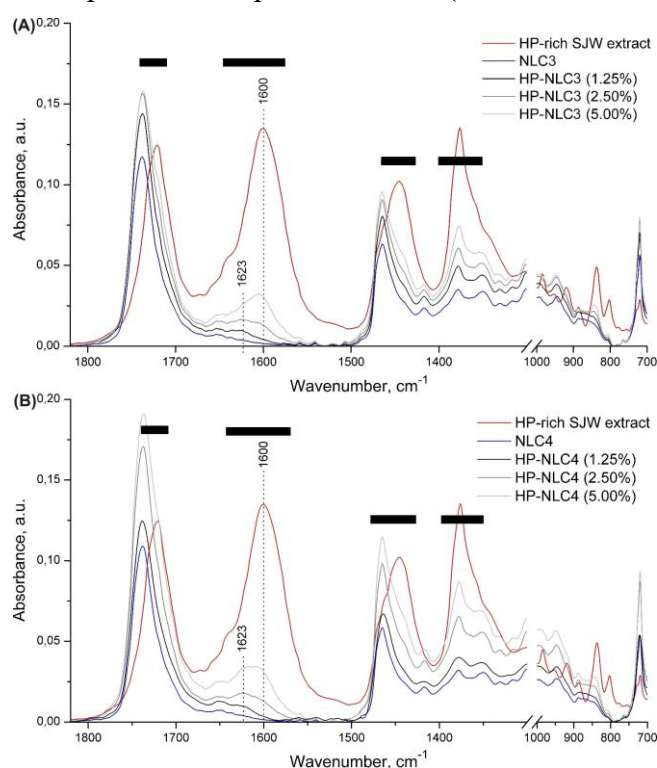
Таблица 4. Ефективност на натоварване на HP-NLC дисперсиите. Представени са средни стойности от трикратно проведени анализи $\pm$ SD.

Ден	HP-NLC3	HP-NLC4
0	70,44 $\pm$ 0,21 ^c	74,49 $\pm$ 0,23 ^a
30	65,61 $\pm$ 0,20 ^d	72,10 $\pm$ 0,25 ^b
180	50,55 $\pm$ 0,18 ^g	63,51 $\pm$ 0,23 ^e
365	41,82 $\pm$ 0,61 ^h	53,47 $\pm$ 0,62 ^f

Легенда: Средните стойности, маркирани с различни буквени индекси, са статистически различни ($p < 0,05$).

2.3.6. Екстракт-липидни взаимодействия

Всички инфрачервени абсорбционни спектри са представени в относително тясна, но информативна спектрална подобласт на средния инфрачервен спектър от 1850 до 700 cm^{-1} (Фигура 12). За да се проверят някои основни качествени аналитични резултати, допълнително бяха приготвени, „пренатоварени“ с екстракт HP-NLC (2,50% и 5,00%, w/w) образци.



Фигура 12. Инфрачервени спектри на екстракт от жълт кантарион, богат на HP (HP-rich SJW extract; червена ивица), „празни“ (NLC3 и NLC4; сини ивици) и натоварени с екстракт липидни наносителни (HP-NLC3 и HP-NLC4; представени с ивици, оцветени в различни нюанси от скалата на сивото според съдържанието на извлек в тях). Спектрите на образците са разделени в две подфигури според вида на съдържащия се в тях течен липид: АО (A) и ВО (B).

Доказателство за успешното енкапсулиране на богатия на HP екстракт от жълт кантарион е общият вид на инфрачервени спектри на HP-NLC3 и HP-NLC4 (1,25%). В маркираните с плътни черни ленти спектрални подобласти, спектрите на въпросните проби носят информация за „генетичните белези“ на техните съставни компоненти – „празните“ наночастици и екстракта.

Най-информативната от всички се оказва областта на C=C вибрации от 1600 до 1630 cm^{-1} , където инфрачервено лъчение се абсорбира единствено от екстракта. Включването на последния в състава на наночастиците в концентрация 1,25% предизвиква появата на едва

забележима абсорбционна ивица с максимум при 1623 cm⁻¹. Същата закономерност се наблюдава и в спектрите на останалите образци, съдържащи 2,50 и 5,00% извлек, но с очакваните количествени изменения в интензитета на въпросната ивица. Заедно с това, обаче, в спектрите на „пренатоварените“ с екстракт образци се регистрира и появата на допълнителна ивица с екстремум при 1600 cm⁻¹ (присъща за самия растителен екстракт). Следователно, въвеждането на по-голямо количество извлек води до образуване на ко-агрегати между екстракта и HP-NLC частиците.

2.3.7. Антивирусното действие

2.3.7.1. Цитотоксичност

Преди провеждането на експериментите за оценка на антивирусната активност беше определен нетоксичният концентрационен обхват на липидните наносуспензии. За всеки образец бяха измерени стойностите цитотоксична концентрация 50%¹⁸ и максимална поносима концентрация¹⁹. Ефектът на липидните образци върху клетъчната жизнеспособност беше сравнен с този на ацикловир – референтна субстанция с доказани антихерпесвирусна активност и ниска токсичност.

„Празните“ NLC образци не демонстрираха токсичност дори при най-високата тествана концентрация. Наносителите с включен екстракт, обаче, показаха цитотоксична активност, по-висока от тази на ацикловир (Таблица 5). Въпреки това, по-ниска MDBK токсичност беше демонстрирана от HP-NLC4 (приблизително 2,5 пъти по-висока от тази на референта).

Таблица 5. Цитотоксичност на изследваните HP-NLC проби. Концентрациите са изразени спрямо растителния екстракт.

Образец	Цитотоксична концентрация 50% (µg/mL)	Максимално поносима концентрация (µg/mL)
HP-NLC3	87,50 ± 2,30*	12,50
HP-NLC4	94,70 ± 3,60*	12,50
Ацикловир	291,00 ± 9,40	-

Легенда: * – съществува статистически значима разлика с данните от анализа на референтната субстанция при ниво на значимост $p < 0,05$.

2.3.7.2. Ефект върху вирусната репликация

Тестът за инхибиране на цитопатичния ефект беше приложен за изследване антихерпесната активност на NLC и HP-NLC дисперсиите. За да се определи антихерпесния ефект на NLC и HP-NLC суспензиите, бяха оценени инхибираща концентрация 50%²⁰ и индекс на селективност²¹. Като референтен инхибитор на HSV-1-индуцирания цитопатичен ефект беше използван ацикловир.

В дефинирания нетоксичен концентрационен обхват, „празните“ наночастици не показаха ефект върху репликацията на HSV-1, а HP-NLC нанодисперсиите демонстрираха

¹⁸ Концентрацията, при която жизнеспособността на 50% от клетъчния монослой е засегната вследствие токсичното действие на изследваната проба.

¹⁹ Най-високата концентрацията на изследваната проба, която не предизвиква клетъчно увреждане или смърт.

²⁰ Концентрацията на образца, при която се постига редукция на вирус-индуцирания цитопатичен ефект с 50%.

²¹ Съотношение между цитотоксична концентрация 50% и инхибираща концентрация 50%, което дава информация до каква степен действието на образца е насочено спрямо вируса.

значително по-слаба от тази на ацикловир активност (Таблица 6). Въпреки това, действието на HP-NLC4 системата беше определено като по-изразено (по-висок селективен индекс).

Таблица 6. Антивирусна активност на натоварените нанообразци върху HSV-1. Концентрациите са изразени спрямо растителния екстракт.

Образец	Инхибираща концентрация 50% ($\mu\text{g/ml}$)	Индекс на селективност
HP-NLC3	$25,30 \pm 2,20^*$	3,46
HP-NLC4	$23,70 \pm 2,10^*$	4,00
Ацикловир	$0,33 \pm 0,03$	881,82

Легенда: * – съществува статистически значима разлика с данните от анализа на референтната субстанция при ниво на значимост $p < 0,001$.

2.3.7.3. Вирусоцидно действие

Заедно с потискането на вирусната репликация, инактивирането на вирусите преди постъпването им в клетките е ключово в предотвратяването на инфекция. По тази причина беше изследван ефектът на избраните NLC и HP-NLC дисперсии върху извънклетъчните HSV-1 вириони. В качеството на контролен стандарт, поради доказаната ефективност срещу капсулирани и некапсулирани вируси, беше използван 70% етанол.

Нито една от изследваните проби не показва значително понижаване на вирусното натоварване в рамките на 120 min (Таблица 7). Освен че доказват отсъствието на вирусоциден ефект, получените резултати допускат възможността натоварените наносистеми да служат само като носители, които не освобождават екстракта и съдържащият го HP извън клетката.

Таблица 7. Вирусоцидно действие на изследваните наносистеми спрямо HSV-1.

Образец	$\Delta\log$				
	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min
NLC3	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
HP-NLC3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
NLC4	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
HP-NLC4	0,50	0,50	0,75	0,75	0,75
Етанол 70%	8,00	8,00	8,00	8,00	7,75

2.3.7.4. Влияние върху вирусната адсорбция

За да се потвърди или отхвърли хипотезата за ролята на NLCs и вътреклетъчното действие на HP-NLCs, в допълнение беше изследван ефектът им върху вирусната адсорбция. Най-отчетливо, но въпреки това незначително, е понижението на вирусния товар след едночасова експозиция с HP-NLC4 (Таблица 8).

Таблица 8. Ефект на NLC и HP-NLC дисперсиите върху началния етап от жизнения цикъл на HSV-1.

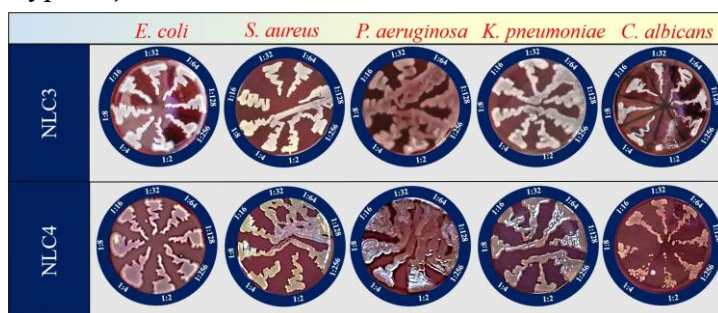
Образец	$\Delta\log$			
	15 min	30 min	45 min	60 min
NLC3	0,25	0,25	0,25	0,50
HP-NLC3	0,25	0,25	0,50	0,50
NLC4	0,00	0,25	0,25	0,50
HP-NLC4	0,25	0,25	0,50	0,75

Липсата на значима промяна във вирусните титри показва, че нито един от изследваните образци не влияе върху взаимодействието между вирусните структури и клетъчните мембрани. С това се потвърждава, че изследваните липидни наночастици функционират само като преносители на екстракта.

2.3.8. Антимикробна ефективност

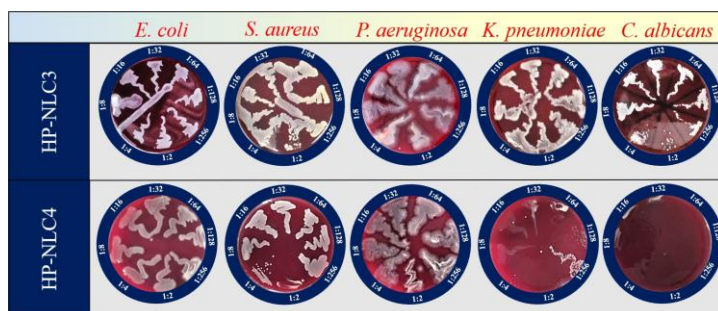
Антимикробната активност на четирите липидни наносуспензии беше изследвана, като за целта бяха определени техните минимални инхибиторни и бактерицидни/фунгицидни концентрации. След разреждане, инокулиране и инкубиране (т. 2.3.2.8 от раздел „Материали и методи“), всички тестови проби придобиха непрозрачен вид, присъщ на NLC/HP-NLC дисперсиите. Аналогичен външен вид имаха и заложените отрицателни контроли. Следователно, определянето на минималните инхибиторни концентрации чрез визуална оценка на мътността, свързана с микробния растеж, не беше възможно. По същата причина бяха определени единствено минималните бактерицидни и фунгицидни концентрации на всяка наносуспензия.

Възможността за наличие на антимикробен ефект при „празните“ наноносители беше допусната поради докладваното в литературата микробицидно действие на използваните течни липиди спрямо *S. aureus* (за BO), *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* (за АО). Въпреки това, ненатоварените образци не демонстрираха активност срещу прицелните патогенни микроорганизми (Фигура 13).



Фигура 13. Антибактериална и антимикотична активност на NLC3 и NLC4.

И при двете заредени с екстракт нанодисперсии беше наблюдавана антимикробна активност спрямо посочените патогени, но ефектът на HP-NLC4 е значително по-отчетлив (Фигура 14). За гореспоменатата дисперсия бяха установени минимална бактерицидна концентрация от 0,0977 mg/mL (разреждане 1:128) спрямо *K. pneumoniae* и минимална фунгицидна концентрация от приблизително 0,0488 mg/mL (разреждане 1:256). По-слаба, но налична активност беше регистрирана и спрямо *S. aureus* – с минималната бактерицидна концентрация от 6,25 mg/mL (разреждане 1:2). Ефектът и на двата HP-NLC образца спрямо Грам-отрицателните *E. coli* и *P. aeruginosa* е отрицателен.



Фигура 14. Антибактериална и антимикотична активност на HP-NLC3 и HP-NLC4.

Получените резултати свидетелстват, че установеното антимикробно действие на HP-NLC образците се дължи изцяло на присъстващия в тях екстракт, а не на някои от структурните им компоненти. Въпреки това, поради изключителната химическа нестабилност на HP, влагането на екстракта в наноносители може да се разглежда като наложително за проява на изследваната активност. Това наблюдение само подчертава практическото значение на настоящия дисертационен труд.

Изводи:

- *Наночастиците запазват своята структура след инкорпориране на богатия на HP екстракт от жълт кантарион. Те не проявяват видими признаци на физична нестабилност в рамките на едногодишен период на съхранение при 4 °C. Наблюдават се промени по отношение на средния размер на техните частици, разпределението им по размер и зета потенциала. Отчетените изменения са по-слабо проявени при HP-NLC4;*
- *Включването на екстракта е успешно и в двата нанообразца. Липсата на липидни полиморфни преходи в наноносителите предполага, че структурата им се запазва стабилна във времето и отхвърля възможността от неконтролирано, рязко освобождаване на екстракта. Доказана е и пригодността на количеството включен извлек. С по-добра способност за стабилизиране на HP в него се отличават HP-NLC4 наночастиците;*
- *Установен е микробициден ефект на HP-NLC дисперсиите спрямо K. pneumoniae, S. aureus и C. albicans. Слабо изразено, но въпреки това присъстващо, е и антивирусното им действие спрямо HSV-1. По-отчетлив ефект върху изследваните патогени се наблюдава при HP-NLC4. Отсъствието на такъв при незаредените наночастици доказва активността на екстракта, богат на HP.*

Въз основа на получените данни, HP-NLC4 беше избран като предпочитан носител на екстракта от жълт кантарион, богат на HP. Ниският вискозитет на нанодисперсията наложи включването ѝ в полутвърда дермална форма преди приложение. За целта, бяха получени и охарактеризирани осем бифазни гела (бигели) – „празни“ и натоварени с HP-NLC4.

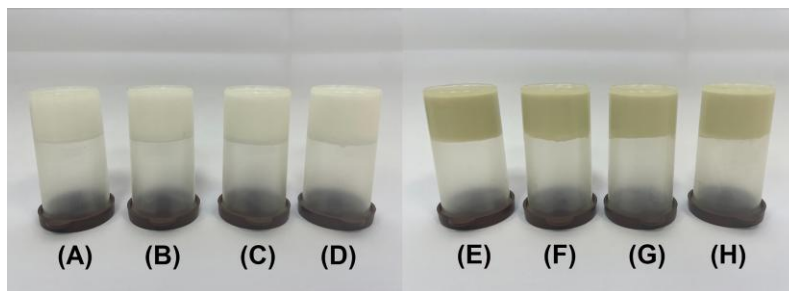
3. Разработване и охарактеризиране на полутвърда лекарствена форма (бифазен гел) с включени наноструктурни липидни носители, натоварени с богат на хиперфорин екстракт от жълт кантарион

3.1. Външен вид

Всички бигелове бяха опаковани в полиетиленови кутии (непосредствено след тяхното приготвяне). Също както липидните нанодисперсии, полутвърдите състави бяха фотографирани в прозрачни плоскодънни епруветки с цел онагледяване на техните макроскопски качествени белези. Пригответените „празни“ състави представляват бели, полутвърди маси, а натоварените полутвърди форми са „приели“ бледозеления цвят на HP-NLC4 дисперсията (Фигура 15).

Фигура 15 представя и резултата от теста с обърнатата епруветка. Изпитването беше приложено с цел да се потвърди структурирането на системите – в случая, образуването на

стабилна гелна мрежа. Липсата на разтичане под действие на тяхната маса доказва, че изготвените бигелове притежават достатъчна структурна стабилност и определена граница на течене.

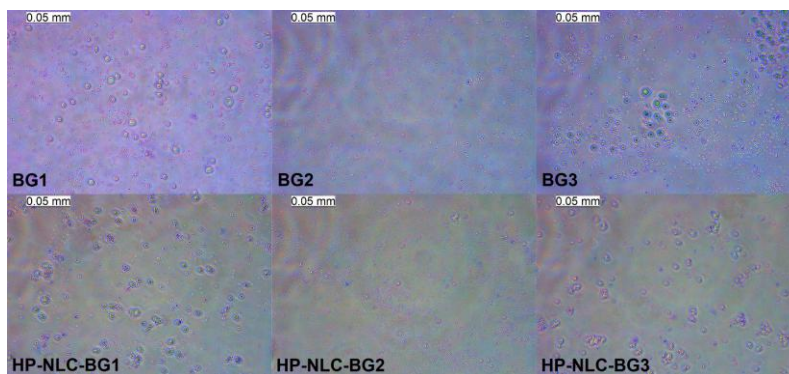


Фигура 15. Външен вид на BG1 (A), BG2 (B), BG3 (C), BG4 (D), HP-NLC-BG1 (E), HP-NLC-BG2 (F), HP-NLC-BG3 (G) и HP-NLC-BG4 (H).

Бигеловите, съдържащи 40% маслена фаза, притежават различна текстура. Вследствие на тяхното по-високо олеогелно съдържание, съответните образци придават т.нар. „мазно усещане при допир“. Поради това, с BG4 и HP-NLC-BG4 не бяха проведени по-нататъшни изследвания.

3.2. Морфологични характеристики

Хомогенността в разпределението на двете фази в бигеловите беше оценена посредством оптична микроскопия. Във всички микрографии се наблюдават прозрачни капки органогел, диспергирани в оцветената с метиленово синьо хидрогелна основа (Фигура 16).



Фигура 16. Микрографии на празни и натоварени с HP-NLC4 дисперсия бигели.

В BG1 и BG3 се наблюдават неравномерно разпределени по размер капки олеогелна фаза, включително и такива с по-голям от 5 μm диаметър. За разлика от тях, BG2 видимо притежава по-висока степен на еднородност. Що се отнася до съответните HP-NLC4-съдържащи полутвърди форми, като по-хомогенен отново се откроява съставът, съдържащ 20% маслена фаза. По подобие на „празните“ бигелове, и в състава на HP-NLC-BG1 и HP-NLC-BG3 се откриват олеогелни агрегати.

3.3. pH

В качеството на предиктивен метод за оценка поносимостта на приготвените бигели беше проведен pH анализ. За съвместими с кожата се считат състави, които притежават близки до тези на слабо киселата дермална повърхност pH стойности (pH 4÷6). Водородните показатели на полутвърдите носители попадат в границите от $6,04 \pm 0,01$ до $6,82 \pm 0,05$ (Таблица 9).

Таблица 9. рН-стойности на изследваните бигели. В таблицата са представени средните от три измервания стойности $\pm$ SD.

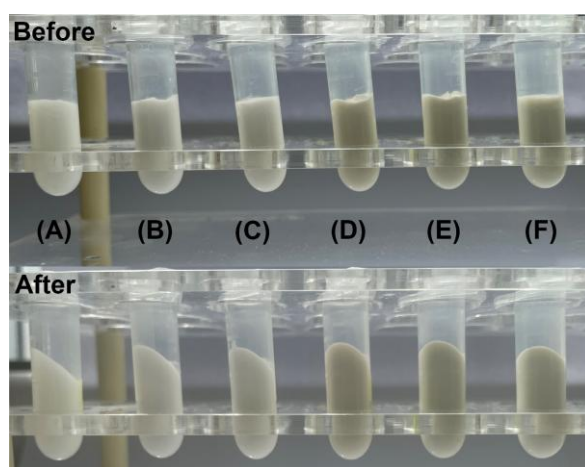
Образец	рН стойност
BG1	$6,79 \pm 0,07^a$
BG2	$6,81 \pm 0,05^a$
BG3	$6,82 \pm 0,01^a$
HP-NLC-BG1	$6,05 \pm 0,01^b$
HP-NLC-BG2	$6,04 \pm 0,01^b$
HP-NLC-BG3	$6,05 \pm 0,03^b$

Легенда: Средните стойности, маркирани с еднакви буквени индекси, са статистически неразличими ($p < 0,05$).

Включването на нанодисперсията предизвиква значимо повишаване на киселинността. Въпреки това, стойностите на рН на всички полутвърди форми са близки до физиологично поносимите за кожата. Следователно, не се очаква нито един от бигеловите да предизвика раздразнение след приложение.

3.4. Физична стабилност

На Фигура 17 са представени фотографите на изпитваните бигелове непосредствено преди и след провеждането на ускорен тест за стабилност чрез центрофугиране. При нито един от съставите не се наблюдава фазово разделяне под действие на приложената центробежна сила (4000 rpm за 10 min и при 5000 rpm за същото време). Те запазват своята структурна цялост и следователно, са физично стабилни.



Фигура 17. Външен вид на BG1 (A), BG2 (B), BG3 (C), HP-NLC-BG1 (D), HP-NLC-BG2 (E) и HP-NLC-BG3 (F) преди и след центрофугиране.

3.5. Механични свойства

Резултатите от проведените механични тестове са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Механични свойства на изготвените бигели. В таблицата са изложени осреднените от трикратни измервания стойности на съответните параметри $\pm$ SD.

Образец	Размазваемост, mm	Твърдост, g	Кохезивност, g.s	Адхезивност, g.s
BG1	$31,50 \pm 0,89^a$	$71,07 \pm 0,09^e$	$86,27 \pm 1,25^d$	$-14,17 \pm 0,63^a$
BG2	$30,17 \pm 0,42^{a,b}$	$74,67 \pm 0,94^e$	$90,37 \pm 1,20^d$	$-16,03 \pm 0,31^a$
BG3	$29,00 \pm 0,41^{b,c}$	$81,00 \pm 2,94^d$	$93,70 \pm 3,77^d$	$-15,13 \pm 1,03^a$

HP-NLC-BG1	$28,17 \pm 0,12^{c,d}$	$112,33 \pm 4,71^c$	$138,80 \pm 9,01^c$	$-19,37 \pm 0,90^b$
HP-NLC-BG2	$26,83 \pm 0,96^d$	$137,33 \pm 3,77^b$	$167,60 \pm 8,71^b$	$-25,10 \pm 0,37^c$
HP-NLC-BG3	$24,75 \pm 1,08^e$	$148,03 \pm 0,08^a$	$182,63 \pm 0,70^a$	$-25,17 \pm 1,35^c$

Легенда: Между маркираните с различни буквени индекси средни стойности във всяка колона съществува статистически значима разлика ($p < 0,05$).

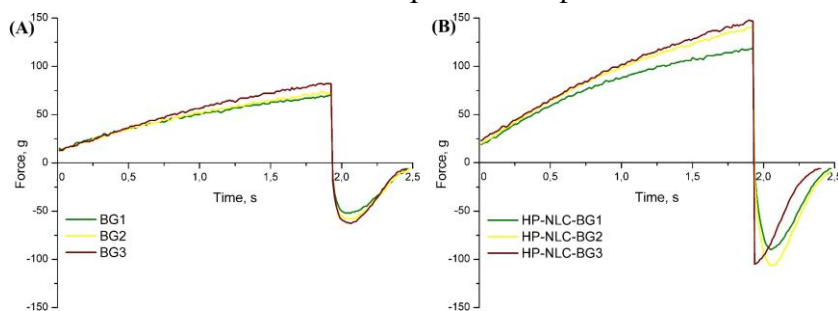
3.5.1. Размазваемост

За да бъде оценена размазваемостта на бигеловите, беше приложен методът на паралелните плочи. Пригответените бигелове притежават диаметри на размазване ($\emptyset$, mm) в интервала от $24,75 \pm 1,08$ до $31,5 \pm 0,89$ mm (Таблица 10). Според представената от Lardy и съавт. класификация, те могат да бъдат описани като много твърди ($\emptyset \leq 40$ mm)²².

След сравняване на двата типа образци („празни“ и натоварени) става ясно, че размазваемостта на всички HP-NLC4-съдържащи бигелове е по-ниска от тази на съответните ненатоварени форми. Вероятно, отчетената закономерност се дължи на по-високия вискозитет на хидрогелната основа, в чийто състав влиза и липидната нанодисперсия. Статистически значима разлика в диаметри на размазване беше отчетена между BG1 и BG3, както и между техните натоварени еквиваленти. Следователно, двадесетпроцентовото олеогелно съдържание може да бъде разгледано като „граница“, над която размазваемостта осезаемо спада.

3.5.2. Твърдост

Твърдостта на изготвените бигелове беше оценена посредством текстурен анализ. Тя беше определена като максималната сила, приложена по време на еднократен едноосен натиск. И трите натоварени с HP-NLC4 бигела се отличават със значително по-висока твърдост (Таблица 10, Фигура 18). Вероятно, по аналогия с параметъра размазваемост, разликите и тук се обуславят от по-високия вискозитет на хидрогелната фаза.



Фигура 18. Графична зависимост сила-време, изведена посредством еднократна едноосна компресия. На подфигура (A) са представени текстурните профили на „празните“, а на (B) – тези на заредените с HP-NLC4 бигели.

Що се касае до влиянието на хидрогел-олеогелното съотношение, значима промяна в изследвания параметър беше отчетена единствено при ненатоварения образец с тридесетпроцентно съдържание на маслена фаза. При натоварените бигелове се наблюдава плавно повишаване в твърдостта като функция от процентното олеогелно съдържание.

²² В зависимост от диаметъра на размазване ($\emptyset$, mm), полутвърдите форми могат да бъдат класифицирани като течни ($\emptyset > 70$ mm), полутечни ($70 \geq \emptyset > 55$ mm), полутвърди ($55 \geq \emptyset > 47$ mm), твърди ($47 \geq \emptyset > 40$ mm) и много твърди ($\emptyset \leq 40$ mm).

Lardy, F., Vennat, B., Pouget, M.P., Pourrat, A. (2000) 'Functionalization of hydrocolloids: Principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels', Drug Development and Industrial Pharmacy, 26, 715-721.

3.5.3. Кохезивност

Кохезивността на бигеловите беше определена като положителната площ под изведената крива сила-време (Фигура 18). Вероятно, поради съществуващата зависимост с твърдостта, кохезивността на HP-NLC4-съдържащите състави значително превишава тази на техните „празни“ аналози. Покачването на олеогелното съдържание, обаче, води до осезаема промяна в изследвания параметър единствено при натоварените бигелове.

3.5.4. Адхезивност

Отрицателните площи под текстурните криви дават информация за адхезивността на изследваните образци (Фигура 18). Присъствието на липидната нанодисперсия в бигеловите, съвсем очаквано, оказва съществено влияние и върху този техен параметър. Трите „празни“ състава демонстрират съизмерима адхезивност, но включването на HP-NLC4 се съпровожда със значително нарастване в степента на този техен механичен показател.

Отчетените разлики в адхезивността на HP-NLC-BG1 и HP-NLC-BG3 се свързват отново с влиянието на хидрогел-олеогелното съдържание. Присъствието на 20% липофилна фаза води до получаването на максимално адхезивни бигелове – при увеличаване на процентното ѝ съдържание не настъпват значими промени в изпитвания параметър.

3.6. Реологично поведение

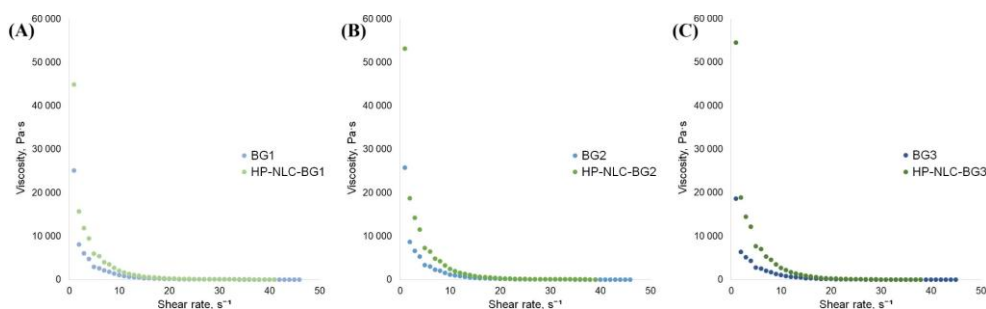
Данните от реологичните анализи на „празните“ бигелове са представени в Таблица 11. Сред избраните математически модели, този на Хершел-Бълкли описва най-точно свойствата на течене на BG1 и BG3. За това свидетелства и коефициентът на детерминация $R^2 = 0,99$.

Таблица 11. Реологични параметри на „празните“ бигели, изчислени с помощта на различни математически модели. В таблицата са изложени осреднените от трикратни измервания стойности $\pm SD$.

Математически модел	BG1	BG2	BG3
Вископластичен модел на Бингам	$\eta_p = 0,57 \pm 0,04 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 354,89 \pm 9,10 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,84$	$\eta_p = 0,30 \pm 0,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 440,44 \pm 22,92 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,17$	$\eta_p = 0,77 \pm 0,06 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 365,43 \pm 12,28 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,78$
Модел на Оствалд де Вееле	$K = 322,63 \pm 0,10 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,11 \pm 0,01$ $R^2 = 0,88$	$K = 394,62 \pm 17,45 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,08 \pm 0,01$ $R^2 = 0,72$	$K = 328,76 \pm 6,02 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,12 \pm 0,01$ $R^2 = 0,96$
Модел на Хершел-Бълкли	$\tau_0 = 283,59 \pm 4,41 \text{ Pa}$ $K = 37,12 \pm 3,25 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,38 \pm 0,01$ $R^2 = 0,99$	$\tau_0 = 0 \pm 0,01 \text{ Pa}$ $K = 394,72 \pm 48,40 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,08 \pm 0,01$ $R^2 = 0,60$	$\tau_0 = 236,02 \pm 8,64 \text{ Pa}$ $K = 88,59 \pm 7,99 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,28 \pm 0,01$ $R^2 = 0,99$

Легенда: τ_0 , граница на течене; η_p , пластичен вискозитет; K , коефициент на консистенция; n , индекс на течене.

BG1 и 3 притежават индекси на течене, чиято стойност е по-малка от единица. Следователно, те могат да бъдат дефинирани като състави с псевдопластични свойства. Графичната зависимост между динамичния вискозитет и приложената скорост на срязване потвърждава тяхното реологично поведение (Фигура 19).



Фигура 19. Зависимост между скоростта на срязване и вискозитета при BG1 и HP-NLC-BG1 (A), BG2 и HP-NLC-BG2 (B) и BG3 и HP-NLC-BG3 (C).

Установените стойности на τ_0 предполагат, че с увеличаване на олеогелното съдържание се “улеснява” флуидизацията на бигеловите. Въпреки че границата на течене може да се разглежда и като мярка за кохезивността на даден образец, в случая, подобна корелация не се наблюдава. Съизмеримите стойности на кохезивност при BG1 и BG3 (т. 3.5.3 от раздел „Резултати и дискусия“) вероятно се дължат на формираната в резултат на множество слаби връзки здрава гелна мрежа. Предпоставка за допускането на тази хипотеза е наличието на агрегати от олеогелни капки и в двата състава (т. 3.2 от раздел „Резултати и дискусия“). Тяхното различно разпределение в хидрогелната база е възможна причина за улесненото течение на BG3.

В съдържащия 30% маслена фаза бигел се наблюдава и осезаемо по-висока стойност на индекса на консистенция. Поради неговата пряка връзка с вискозитета, този параметър може да „обясни“ по-ниската размазваемост и по-високата твърдост на BG3.

Въпреки относително ниския коефициент на детерминация, $R^2 = 0,72$, моделът на Оствалд де Вееле отразява в най-голяма степен реологичното поведение на BG2. Стойността на индекса на течение на въпросния състав е също по-малка от единица и свидетелства за неговите псевдопластични свойства.

Що се касае до HP-NLC4-съдържащите бигелове, реологията и на трите образца се описва най-точно с модела на Хершел-Бълкли (Таблица 12).

Таблица 12. Реологични параметри на натоварените с HP-NLC4 бигели, изчислени с помощта на различни математически модели. В таблицата са представени осреднените от трикратни измервания стойности $\pm$ SD.

Математически модел	HP-NLC-BG1	HP-NLC-BG2	HP-NLC-BG3
Вископластичен модел на Бингам	$\eta_p = 2,22 \pm 0,01 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 627,68 \pm 8,32 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,93$	$\eta_p = 2,61 \pm 0,17 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 758,79 \pm 9,49 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,86$	$\eta_p = 3,05 \pm 0,15 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ $\tau_0 = 778,84 \pm 6,57 \text{ Pa}$ $R^2 = 0,92$
Модел на Оствалд де Вееле	$K = 627,79 \pm 14,58 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,11 \pm 0,01$ $R^2 = 0,88$	$K = 768,86 \pm 8,86 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,06 \pm 0,01$ $R^2 = 0,87$	$K = 768,89 \pm 8,86 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,06 \pm 0,01$ $R^2 = 0,87$
Модел на Хершел-Бълкли	$\tau_0 = 578,53 \pm 2,53 \text{ Pa}$ $K = 27,09 \pm 1,52 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,55 \pm 0,01$ $R^2 = 0,99$	$\tau_0 = 682,31 \pm 5,41 \text{ Pa}$ $K = 59,90 \pm 4,94 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,40 \pm 0,02$ $R^2 = 0,99$	$\tau_0 = 762,52 \pm 8,15 \text{ Pa}$ $K = 11,35 \pm 3,77 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ $n = 0,73 \pm 0,07$ $R^2 = 0,94$

Легенда: τ_0 , граница на течене; η_p , пластичен вискозитет; K , коефициент на консистенция; n , индекс на течение.

Заредените с липидна нанодисперсия полутвърди форми могат също да се причислят към класа на псевдопластичните ненютонови системи. Като доказателство за това служат техните ниски n -стойности и зависимостта на динамичния им вискозитет от скоростта на деформация (Таблица 12, Фигура 19). Съгласно установените τ_0 -стойности, по-високоустойчиви на деформация структури се получават, когато процентното съдържание на маслена фаза в натоварените с HP-NLC4 бигелове нараства. Тази закономерност потвърждава достоверността на направените в т. 3.5 на раздел „Резултати и дискусия“ изводи относно измененията в техните механични свойства.

Сред изследваните образци, HP-NLC-BG2 показва най-нисък индекс на течене и най-висок коефициент на консистенция. Отчетената корелация между n и K се асоциира с изразено псевдопластично поведение. Като цяло, при дермалните полутвърди форми, този тип реологично поведение е предпочитано от пациентите, тъй като нанасянето върху кожата е улеснено. Следователно, измежду всички натоварени бигелове, се очаква HP-NLC-BG2 да притежава предпочетена текстура.

Изводи:

- Изготвените бигелове („празни“ и натоварени с HP-NLC4) притежават достатъчна физична стабилност и кожна рН поносимост. Като по-еднородни измежду тях се открояват съставите, съдържащи 20% маслена фаза;
- Увеличаването на олеогелното съдържание оказва съществен ефект върху размазваемостта и твърдостта на „празните“ бигелове, а също и върху кохезивността и адхезивността на натоварените с нанодисперсия полутвърди форми;
- Изпитваните образци проявяват псевдопластични свойства. С оптимална консистенция и структурна хомогенност се открояват системите с хидрогел-олеогелно съотношение 80:20.

Вземайки предвид всички проведени изследвания и направени изводи, HP-NLC-BG2 беше избран като носител за наноенкапсулирания богат на HP екстракт от жълт кантарион. Последна стъпка е *in vivo* изпитване на неговите ранозаздравяващи и антиоксиданти свойства върху експериментални животни.

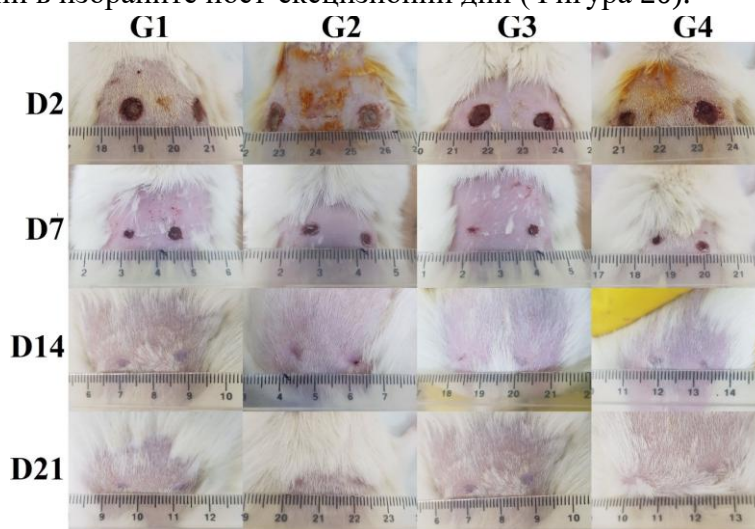
4. *In vivo* проучване на ранозаздравяващия потенциал на изготвената крайна полутвърда лекарствена форма върху модел на ексцизионна рана при експериментални животни

4.1. Проследяване в динамика на тъканното възстановяване по настъпилите с времето промени в размера на предизвиканите рани

В дисертационния труд беше приложен ексцизионен раневи модел. За целта, върху експериментални животни (плъхове Wistar) бяха образувани две дорзални, симетрични спрямо срединната равнина, кръгли рани с диаметър 6 mm. Върху тях, в рамките на дву-, седем-, четиринадесет- и двадесет и един-дневни периоди, еднократно (веднъж дневно) беше апликиран HP-NLC-BG2. Неговият терапевтичен потенциал беше сравнен с този на търговски растителен продукт, използван в качеството на положителна контрола. За да се оцени индивидуалното влияние на HP спрямо останалите компоненти на екстракта, в изследването беше включен допълнителен бигел – HP-BG2. Последният е с аналогично на HP-NLC-BG2

хидрогел-олеогелно съдържание и екстрактна концентрация. Извлекът в него, обаче, беше включен „незащитен“ в маслената база на олеогела преди желиране. В експеримента беше заложена и негативна контрола от нетретирани животни.

Динамиката в ранозаздравяването беше проследена визуално. За целта, раневите области бяха фотографирани в избраните пост-ексцизионни дни (Фигура 20).



Фигура 20. Фотографии, представящи постигнатия ранозаздравителен прогрес. С **G1** е отбелязана отрицателната контролна група (нетретирани животни), а с **G2** – положителната контролна група. Групата на животните, третирани с бигел, съдържащ богат на HP екстракт от жълт кантарион (HP-BG2) е маркирана с **G3**, а тази на животните, върху които е приложен HP-NLC-BG2 – с **G4**. Фотографиите са снети в няколко пост-ексцизионни времеви интервала – дву- (**D2**), седем- (**D7**), четиринадесет- (**D14**) и двадесет и един-дневен (**D21**).

Фотографиите доказват постигнатото пълно ранево възстановяване във всички изследвани групи в ден двадесет и първи. Въпреки това, регенерация настъпва видимо по-бързо при животните, третирани с изготвените бигелове, като това се отчита още в ден втори.

Диаметърът на раните при всички експериментални животни беше коректно отчетен с помощта на електронен шублер. Резултатите са изложени в Таблица 13.

Таблица 13. Размер на раните в хода на експеримента. В таблицата е изложен и първоначалния размер на раните (**D0**). Резултатите са представен във вид на среден от седем измервания диаметър $\pm$ SD.

Изследователски период, дни	Среден диаметър на раната, mm			
	G1	G2	G3	G4
D0	6,000 $\pm$ 0,000 ^a	6,000 $\pm$ 0,000 ^a	6,000 $\pm$ 0,000 ^a	6,000 $\pm$ 0,000 ^a
D2	5,250 $\pm$ 0,274 ^b	4,667 $\pm$ 0,517 ^c	3,917 $\pm$ 0,585 ^d	3,750 $\pm$ 0,524 ^{d,e}
D7	4,750 $\pm$ 0,274 ^{b,c}	3,583 $\pm$ 0,801 ^{d,e,f}	3,333 $\pm$ 0,258 ^{d,e,f,g}	3,000 $\pm$ 0,447 ^{f,g,h}
D14	4,683 $\pm$ 0,419 ^c	3,568 $\pm$ 0,485 ^{d,e,f}	3,287 $\pm$ 0,181 ^{e,f,g}	2,435 $\pm$ 0,176 ^h
D21	2,833 $\pm$ 0,517 ^{g,h}	3,167 $\pm$ 0,983 ^{e,f,g}	2,583 $\pm$ 0,585 ^h	1,500 $\pm$ 0,548 ⁱ

Легенда: Средните стойности, маркирани с различни буквени индекси, са статистически различни ($p < 0,05$).

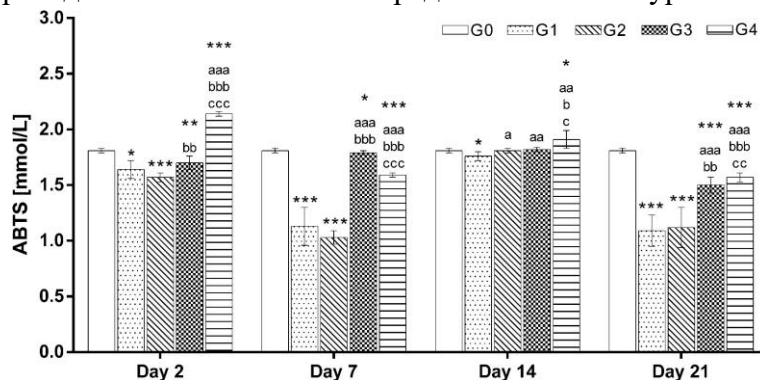
Изложените данни потвърждават направените визуални наблюдения – установеният на втория ден терапевтичен ефект е най-значим при експериментални групи 3 и 4. След 14-дневно приложение, диаметърът на раните при третираниите с HP-NLC-BG2 животни е значимо по-малък от тези, отчетени при останалите групи. Въпреки че във всяка експериментална група се установява видима регенерация на двадесет и първия ден, най-малък остава размерът на раната в G4 ($1,500 \pm 0,548$ mm).

4.2. Определяне на плазмен антиоксидантен статус

Антиоксидантната активност на HP-NLC-BG2 беше оценена посредством ABTS и MDA методи. И двата анализа бяха проведени с взети в края на всеки от определените ранозаздравителни периоди плазмени проби. Освен вече описаните експериментални групи (G1-G4), в оценката на антиоксидантния статус беше заложена и допълнителна такава. Последната е означена като здрава контрола (G0). На включените в нея седем експериментални животни не бяха образувани рани.

4.2.1. Антиоксидантен капацитет

Данните от проведения ABTS анализ са представени на Фигура 21.



Фигура 21. Плазмен антиоксидантен капацитет на здрави експериментални животни (G0) и заложените експериментални групи (G1–G4). Представени са осреднени от трикратни измервания стойности, получени в четирите пост-ексцизионни интервала – D2, D7, D14, D21.

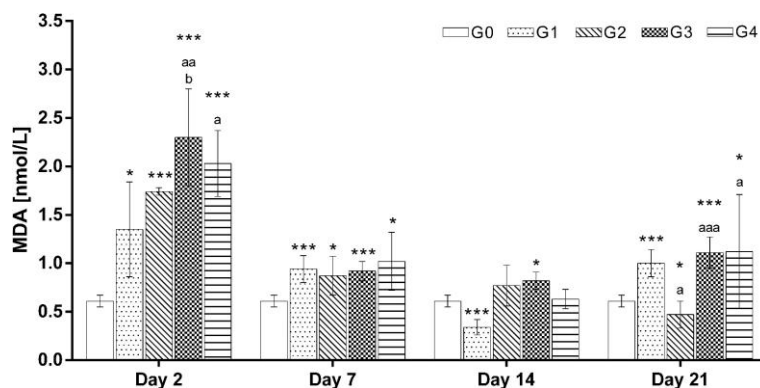
Легенда: Индексите представят статистически значими разлики: * – спрямо G0; a – спрямо G1, b – спрямо G2; c – спрямо G3. Нивото на статистическа значимост е отразено чрез броя знаци – един ($p < 0,05$), два ($p < 0,01$) или три ($p < 0,001$).

Нетретираниите животни показват значително по-нисък плазмен антиоксидантен капацитет от здравите през всички ранозаздравителни периоди. С това, резултатите потвърждават „способността“ на кожните рани да функционират като източник на свободни радикали.

Прилагането на съдържащите богат на HP екстракт от жълт кантарион бигелове води до подобрен антиоксидантен статус. Такъв е установен спрямо нетретираниите животни на седмия, четиринадесетия и двадесет и първия ден. Освен това, HP-BG2 и HP-NLC-BG2 демонстрират по-отчетлив и спрямо растителния референт ефект. Същевременно, установения на двадесет и първия ден антиоксидантен капацитет в G3 и G4 е значително по-нисък от този в G0, но и по-висок от измерения в G1. Възможна причина за тези резултати е концентрационно-зависимата способност на антиоксидантите да действат като про-оксиданти. Подобни данни са представени и за водно-етанолни извлеци от жълт кантарион, и те най-вероятно са присъщи и за тук използвания богат на HP екстракт.

4.2.2. Степен на оксидативен стрес

Резултатите от количественото определяне на MDA са представени на Фигура 22.



Фигура 22. Степен на оксидативен стрес при изследваните групи експериментални животни (G0–G4).

Представени са осреднени от трикратни измервания стойности, получени в четирите пост-ексцизионни интервала (D2, D7, D14, D21).

Легенда: Индексите представят статистически значими разлики: * – спрямо G1; a – спрямо G2, b – спрямо G3. Нивото на статистическа значимост е отразено чрез броя знаци – един ($p < 0,05$), два ($p < 0,01$) или три ($p < 0,001$).

Повишени нива на MDA при нетретираните животни бяха отчетени на втори и седми пост-ексцизионни дни. На четиринадесетия ден обаче, този показател приема по-ниска от регистрираната при здравите животни стойност (0,34 спрямо 0,61 nmol/L).

Изготвените бигелове не оказват „благоприятно“ влияние върху изследвания маркер. Неговите стойности в съответните групи се запазват по-високи от тези в отрицателната контрола през всички ранозаздравителни периоди. Отчетените на втори и седми ден нива на MDA в G3 и G4 са по-високи и от тези в G2. Освен това, измерените след двадесет и едnodневно приложение на търговския продукт стойности са значително по-ниски отколкото във всички останали групи.

Изводи:

- Ранозаздравяващото действие на бифазните гелове беше *in vivo* потвърдено посредством ексцизионен ранев модел, приложен върху експериментални животни. С най-изразен ефект се откроява HP-NLC-BG2;
- Съгласно получените резултати от ABTS и MDA анализите, антиоксидантният ефект на HP-NLC-BG2 и HP-BG2 се осъществява предимно чрез отстраняване на свободните радикали.

V.Изводи

1. Установено е влиянието на използваните количества растителна субстанция и екстрагент (безводен дихлорметан) върху концентрацията на НР в екстракти от жълт кантарион, получени чрез 48-часова мацерация в аргонова среда при отсъствие на светлина. С увеличаване на вложеното съотношение растителна маса/органичен разтворител (от 1:2,5 до 1:3,33) нараства и екстракционният добив на търсения флороглуцинол (от приблизително 25% до повече от 40%).
2. Отчетен е ефектът от експерименталните условия (скорост на хомогенизиране, продължителност на ултразвуковата обработка и температура на ултрасонифициране) върху средния размер и разпределението на частиците по размер, зета потенциала и стабилността на разработените чрез високоскоростна хомогенизация с ултрасонификация NLC носители (в състав глицерил бехенат/бял пчелен восък и бадемово масло/масло от пореч). По-високата хомогенизационна скорост (15 000 rpm) води до дестабилизиране на липидните нанодисперсии. По-краткото ултразвуково приложение (5 min) определя по-ниска степен на еднородност и по-голям среден размер на частиците. Различният температурен режим на ултрасонификация (4 или 25 °C) не влияе върху изследваните физикохимични характеристики.
3. Включването на екстракта е успешно в два избрани нанообразаца – НР-NLC3 и НР-NLC4 (в състав глицерил бехенат и бадемово масло или масло от пореч). Те не проявяват видими признаци на физична нестабилност в рамките на едногодишно съхранение при 4 °C. Въпреки установените статистически значими промени във физикохимичните характеристики на наноносителите, образецът, базиран на масло от пореч (НР-NLC4), запазва среден размер на частиците под 200 nm, индекс на полидисперсност, по-малък от 0,3, и високи стойности на зета потенциал $|\zeta| > 35 \text{ mV}$ и ефективност на натоварване ($> 50\%$).
4. Включването на богатия на НР екстракт от жълт кантарион не оказва влияние върху структурната цялост и вътрешната морфология на НР-NLC3 и НР-NLC4. Потвърденото отсъствие на липидни полиморфни преходи свидетелства за тяхната стабилност във времето.
5. НР-NLC4 нанодисперсията, в състав глицерил бехенат и масло от пореч, се отличава с по-изразен микробициден ефект спрямо *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans* и HSV-1 в сравнение с НР-NLC3, съдържаща глицерил бехенат и бадемово масло.
6. Установено е влиянието на използваното хидрогел-олеогелно съотношение за получаване на стабилни „празни“ и натоварени с НР-NLC4 бигелове, базирани на полуксамер 407, масло от пореч и сорбитан моностеарат. С увеличаване съдържанието на липофилна фаза се повишават размазваемостта и твърдостта на ненатоварените бигелове, а също и кохезивността и адхезивността на НР-NLC4-съдържащите бифазни носители. Реологичното поведение на всички получени полутвърди форми („празни“ и натоварени) е псевдопластично. С оптимална консистенция и структурна

еднородност се отличава бигела с хидрогел-олеогелно съотношение 80:20 (HP-NLC-BG2).

7. HP-NLC-BG2 се характеризира с изразено ранозаздравяващо действие, *in vivo* потвърдено посредством приложен върху експериментални животни ексцизионен ранев модел. Съгласно получените резултати от ABTS и MDA анализите, неговият антиоксидантен ефект се изразява предимно чрез отстраняване на свободните радикали.

VI. Приноси

С научно-теоретичен характер

1. Изведен е оптималният липиден състав (глицерил бехенат и масло от пореч или бадемово масло) и са установени експериментални условия за получаване на стабилни NLCs (скорост на хомогенизация 10 000 rpm и ултрасонифициране при 25 °C в продължение на 15 min).
2. За пръв път NLCs, включително и базирани на глицерил бехенат и бадемово масло/масло от пореч, са натоварени с екстракт от жълт кантарион, богат на HP (> 40%).
3. Формулиран е оптимален по отношение на среден размер и разпределение по размер на частиците, зета потенциал, степен на кристалност, ефективност на натоварване, физична стабилност, *in vitro* антимикробна ефективност и антивирусно действие NLC носител на богат на HP екстракт от жълт кантарион (в състав глицерил бехенат, масло от пореч, полисорбат 80 и сорбитан моноолеат).
4. За пръв път бигел е ползван като полутвърд носител за дермално приложение на NLCs, включително и на такива, натоварени с богат на HP екстракт от жълт кантарион.
5. Формулиран е бигел, базиран на желирана с полксамер 407 HP-NLC4 нанодисперсия, масло от пореч и сорбитан моностеарат, който притежава оптимални за приложение върху кожата механични и реологични характеристики.

С научно-приложен характер

1. Разработен е оригинален протокол за получаване на екстракт от жълт кантарион с високо съдържание на HP (> 40%), включващ 48-часова мацерация на тъмно под аргонска атмосфера при съотношение растителна субстанция:екстрагент (безводен дихлорметан) 1:3,33.
2. Изготвена е иновативна полутвърда лекарствена форма – комбинация от бифазен гел и NLCs (желирана с полксамер 407 липидна нанодисперсия и масло от пореч, структурирано със сорбитан моностеарат), която позволява дермалното приложение на богат на HP екстракт от жълт кантарион и осигурява ускорено ранозаздравяване спрямо референтен растителен продукт.

VII. Списък с научни публикации и участия, свързани с дисертационния труд

Публикации в научни списания

1. **Sotirova, Y.** (2023) 'Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Current Perspectives in Wound Care', *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 10(1), 24-34;
2. **Sotirova, Y.**, Gugleva, V., Stoeva, S., Kolev, I., Nikolova, R., Marudova, M., Nikolova, K., Kiselova-Kaneva, Y., Hristova, M., Andonova, V. (2023) 'Bigel Formulations of Nanoencapsulated St. John's Wort Extract—An Approach for Enhanced Wound Healing', *Gels*, 9(5), 360. **IF 5.0.**

Научни участия

1. **Sotirova, Y.**, Gugleva, V., Stoeva, S., Nikolova, K., Andonova, V. Nanostructured lipid carriers: a promising drug delivery system for hyperforin-rich Saint John's wort extract. Skin Forum 2022, Malmö, Sweden, 21–22 June 2022;
2. **Сотирова, Й.**, Колев, И., Стоева, С., Андонова, В. Наноструктурни липидни носители с включен екстракт от *hypericum perforatum* L. с потенциално приложение върху кожата: предварителни изследвания. Първа научна конференция за студенти и докторанти "ФармаНова", гр. София, 17 декември 2022 г.;
3. **Сотирова, Й.**, Колев, И., Стоева, С., Николова, Р., Николова, К., Андонова, В. НАНОСТРУКТУРНИ ЛИПИДНИ НОСИТЕЛИ С ВКЛЮЧЕН ЕКСТРАКТ ОТ *HYPERICUM PERFORATUM* L. ЗА ДЕРМАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ И УСКОРЕНО ЗАЗДРАВЯВАНЕ НА РАНИ. VIII Конгрес по фармация с международно участие, к.к. Боровец, 27–30 април 2023 г.

Участие в научни проекти

1. Проект №18027 „Липидни наночастици – съвременен технологичен подход за включване на хиперфорин с подобрена химична стабилност в лекарствени форми за локално приложение и ускорено заздравяване на рани” на Фонд „Наука“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна, с ръководител доц. Величка Андонова, д.ф.;
2. Проект № 23011 „Класически 2D и съвременни 3D ALI клетъчни модели за изследване на антимикробните и цитотоксични свойства на нови терапевтични агенти и наноструктурни лекарствени носители“ на Фонд „Наука“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна, с ръководител гл. ас. Надежда Иванова, д.ф.