

АНАЛІЗ КІНЕТИКИ ВИВІЛЬНЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З БІОРОЗКЛАДНИХ МОДИФІКОВАНИХ НАНОЧАСТИНКАМИ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ

М. О. Кумеда*^{ORCID}, Л. Б. Суходуб^{ORCID}, Л. Ф. Суходуб^{ORCID}

Навчально-виробнича лабораторія Біонанокомпозит, Сумський державний університет, вул. Харківська,
126, Суми, 40006, Україна

e-mail: mariyakumeda@gmail.com

Надійшла до редакції 12 червня 2024 р. Переглянута 30 жовтня 2024 р.

Прийнята до друку 12 листопада 2024 р.

Актуальність. Проблема доставлення лікарських засобів у зону уражень тканин людського організму залишається наразі актуальною. Гідроксиапатит (НА), як одна з найбільш відомих кальцій фосфатних (СаР) сполук, використовується як неорганічна складова композитних матеріалів для завантаження ліків. Органічною частиною у композитних матеріалах виступають біополімери, такі як альгінат, агароза, хітозан (CS), колаген і желатин. Наночастинки C₆₀ широко застосовуються як антибактеріальні агенти й здатні зміцнювати структуру композитів. Мікрохвильове опромінення (MW) є методом впливу, який скорочує час синтезу, значно збільшуючи кількість центрів зародкоутворення та зменшуючи розмір утворених кристалітів, що впливає на адсорбційну здатність продукту.

Мета роботи. Більшість сучасних форм доставлення лікарських засобів демонструють швидке вивільнення Цефтріаксону (ЦФТ) та Анестезину (АНА) упродовж 2 днів, яке характеризується «вибуховим вивільненням», що може викликати передозування у перші години використання. Метою даної роботи було дослідити та порівняти кінетику вивільнення лікарських засобів з класично (конвекційно) та MW-синтезованих CS матриць модифікованих НА, мультифазними СаР та наночастинками фулерену C₆₀ для відновлення пошкоджень кісткової тканини впродовж тривалого часу.

Матеріали і методи. Дослідження проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням приладу Agilent 1200 з DAD-детектором ($\lambda = 210\text{--}270$ нм) і хроматографічної колонки C18 (Zorbax SB-C18 4,6×150 мм, 5 мкм) за температури навколишнього середовища.

Результати. НА є хорошим адсорбентом, але важкорозчинною речовиною, тому фармакокінетика вивільнення АНА в основному визначалася ступенем адсорбції препарату поверхнею матеріалу і його дифузійним потенціалом. CS і C₆₀ у складі композитів забезпечують пролонговане вивільнення АНА до 18 днів. Вивільнення ЦФТ з СаР/CS матриць залежить від методу його внесення до композиту: під час синтезу або насиченням після синтезу. Метод насичення характеризується ділянкою швидкого вивільнення впродовж 24–48 годин, а внесення під час

Як цитувати: Кумеда МО, Суходуб ЛБ, Суходуб ЛФ. Аналіз кінетики вивільнення лікарських засобів з біорозкладних модифікованих наночастинками матеріалів на основі хітозану. Біофізичний вісник. 2024;52:21–32. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-02>

In cites: Kumeda M, Sukhodub L, Sukhodub L. Analysis of drug release models from biodegradable nanomodified chitosan based materials. Biophysical Bulletin. 2024;52:21–32. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-02> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

синтезу відтерміновує активне вивільнення до 48–72 годин (початку деградації матриці). Індекс вивільнення приймає значення від $n = 0,56$ до $n = 0,92$, що відповідає кінетиці вивільнення, яка не підпорядковується закону Фіка, тобто наближується до моделі першого порядку.

Висновки. Синтезовані композити на основі CS матриці, модифікованої наноструктурованими частинками CaP та фулерену C_{60} , є потенційними носіями ЦФТ та АНА з функцією їх довготривалого вивільнення у зони уражень кісткової тканини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хітозан; гідроксиапатит; фулерен C_{60} ; вивільнення лікарських засобів; наночастинки.

Упродовж останніх кількох років дослідження можливості використання CaP для доставлення ліків активізувалися. Матеріали на основі CaP використовуються в якості носіїв для доставлення у таргетні зони антибіотиків, протизапальних та протиракових препаратів, білків, вітамінів і гормонів [1]. До факторів, які впливають на вивільнення ліків із композитних матриць, відносяться склад і властивості матеріалу-носія, його пористість і питома поверхня, а також тип і концентрація лікарського препарату, його взаємодія з матрицею та механізм завантаження до композиту [2].

Фізико-хімічні властивості композиту, присутність домішок у формі неорганічних наночастинок або біоактивних речовин, фізіологічні умови оточуючого середовища (величина pH, температура) є основними факторами, які визначають кінетичний профіль вивільнення препарату [2].

Додавання до складу карбонових наночастинок суттєво покращує механічні властивості та стабільність матриць, що надалі може впливати на механіку вивільнення лікарських засобів зі складу композитних біоматеріалів [3, 4]. Фулерен C_{60} , як один з найбільш застосовуваних представників карбонових наночастинок, відомий своєю стабільністю та унікальними фізико-хімічними властивостями, часто застосовується як антибактеріальний агент в медичних матеріалах [5–7].

Гідроксиапатит (НА) один з найбільш відомих CaP, використовується як неорганічна складова композитних матеріалів, в тому числі як адсорбент та носій ліків для подальшого контрольованого їх вивільнення. Органічною частиною у таких матеріалах виступають біополімери, такі як альгінат, агароза, хітозан, колаген і желатин. Завдяки своїм унікальним властивостям біополімери відіграють важливу роль у тканинній інженерії [8]. Полімери можуть бути модифікованими різними способами та іммобілізованими в мікроструктури для досягнення бажаних характеристик. Одним із поширених в біомедицині полімерів є CS, лінійний полісахарид, який може інкапсулювати та пролонговано вивільняти лікарські засоби [9].

Дослідження *in vitro* показали, що біокомпозити з вмістом НА та біополімерів, добре підходять для тривалого контрольованого вивільнення ліків і працюють краще, ніж чистий пресований порошок НА [10]. Особлива увага приділяється розробці кісткових трансплантатів на основі CaP, які розумно поєднують взаємні терапевтичні функції тривалого вивільнення ліків і регенерацію великих дефектів кісткової тканини [11].

MW є багатообіцяльним методом впливу на матеріали, що наразі широко використовується у різних сферах досліджень. Синтез CaP відбувається при чітко визначених умовах, і збереження певної температури є фактором, що суттєво впливає на морфологію, розмір та фазу кальцій фосфату. Так, для синтезу НА потрібно досягти у реакційній суміші температури 80 °C. Метод конвекційного нагрівання нерівномірно передає тепло суміші, що впливає як на час синтезу, так і на параметри кристалітів. Використання MW дозволяє рівномірно нагріти суміш впродовж 5 хвилин, при цьому кількість центрів зародкоутворення значно збільшується, а розмір синтезованих кристалітів є меншим. В результаті збільшується енергетично активна питома поверхня

наночастинок CaP, що зі свого боку впливає на ступінь адсорбції та наступного вивільнення лікарських засобів.

Проблема доставлення лікарських засобів в зону уражень тканин людського організму є актуальною вже великий проміжок часу. Важливими параметрами, на які варто звертати увагу при розробці таких систем, є тип лікарського засобу, період напіврозпаду в організмі, швидкість та тривалість впливу на тканини, його функціональна кількість. ЦФТ — цефалоспорин третього покоління, з високим рівнем антибактеріальної активності проти Грам-позитивних і Грам-негативних бактерій [12]. Однак постійне використання може призводити до зниження його ефективності. Також він може викликати стійкі побічні ефекти, такі як діарея, еозинофілія, тромбоцитоз та інше [13]. Тому, його застосування є обмеженим і потребує розробки систем контрольованого доставлення ЦФТ в цільову ділянку організму. У роботі [14] показано, що ЦФТ завантажений у полімер-ліпідні наночастинок та його вивільнення відбувалося активно протягом перших годин і досягало 80% вже через 2 доби. Вивільнення ЦФТ з системи волокон камеді акації-трагакантової камеді-поліакриламід відповідає моделі першого порядку (відповідно моделі Корсмейєра-Пепаса — дифузія, що не відповідає закону Фіка) [15].

Ще одним часто вживаним знеболювальним лікарським засобом є АНА — лікарський засіб ефірного типу, отриманий з п-амінобензойної кислоти, який також має застереження щодо застосування. Так, відомі випадки метгемоглобінемії після застосування високих доз АНА дітям, а також можливі алергічні реакції. Аналіз вивільнення препарату *in vitro* з гідрогелів на основі CS та полі(вінілпіролідону) (3-меркаптопропіл)-триметоксисилану (MPTMS) у фосфатному буферному фізіологічному розчині (pH 7,4) і симульованій кишковій рідині (pH 6,8) показав >90% вивільнення протягом 2 годин [16].

Згідно з літературними даними, більшість розроблених форм доставлення ЦФТ та АНА демонструють швидке вивільнення впродовж декількох діб, що не задовольняє довготривалий процес лікування ортопедичних травм.

Метою даної роботи було дослідити та порівняти кінетику вивільнення лікарських засобів, внесених різними методами до структури класично та MW-синтезованих композитів на основі CS матриць, модифікованих наночастинами НА та фулерену C₆₀.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали: CS (М.В. 100–300 кДа, ступінь деацетилювання 85%, Acros organics, США); кальцій нітрат тетрагідрат, діамоній дигідрофосфат, амоній гідроксид (виробництво Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.), кальцій хлорид, 85% ортофосфорна кислота, гідроксид натрію (чда, Merck); кальцій ацетат, натрій дигідроортофосфат, оцтова кислота, натрій триполіфосфат (виробництво Китай); C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), приготований згідно [17] та наданий Технічним університетом Ільменау, Інститутом хімії та біотехнології (Німеччина) в рамках співробітництва; комерційно доступні АНА (М.м 165,189 г/моль) та ЦФТ (М.м 554,58 г/моль).

Синтез

НА/CS гідрогель готували за технологією, описаною в [18]. Коротко, до 100 мл 0,1 М CaCl₂ (pH = 12) додавали 100 мл 0,06 М H₃PO₄ з вмістом 0,4 г CS. Отриману суспензію піддавали конвекційному нагріванню (60 °C, 1 година). Після охолодження осад відокремлювали центрифугуванням та промивали деіонізованою водою. Вологість осаду становила 85%. Зразки були названі гідрогелем НА/CS і використані для

подальшого приготування C_{60} -вмісних композитів. Три інші зразки були підготовані за цією ж технологією, але замість класичного конвекційного нагрівання було застосовано мікрохвильове опромінення (MW) різної потужності (300, 600 і 800 W) протягом 5 хв, а зразки були названі відповідно HA/CS300W, HA/CS600W, HA/CS800W. Навантаження зразків лікарським препаратом проводили шляхом їх насичення водним розчином АНА (11,8 мг/мл).

C_{60} HA/CS/АНА гранули. Колоїдний водний розчин C_{60} (2,6 мг/мл) додавали до 3%-го розчину CS (М.В.300 кДа) в 1% оцтовій кислоті, в кількості, яка відповідала 0,0006 та 0,0012 % вмісту C_{60} в готовому композиті. Суміш перемішували під дією ультразвуку. Отримані C_{60} CS суспензії додавали до гідрогелю HA/CS у ваговому співвідношенні 1:1, суміші обробляли ультразвуком упродовж 5 хв, після чого диспергували в 1% розчин триполіфосфату натрію (TPP) та витримували протягом 24 год. Після відокремлення від рідкої фракції фільтруванням, гранули ретельно промивали деіонізованою водою і висушували при температурі 60 °C. Надалі зразки отримали назви 0.0006 C_{60} HA/CS60°C та 0.0012 C_{60} HA/CS60°C. Для визначення впливу фулерену C_{60} на кінетику вивільнення лікарського засобу був отриманий зразок гранул HA/CS (без фулерену). Цей зразок використовувався як контрольний. Навантаження зразків лікарським препаратом проводили шляхом їх насичення водним розчином АНА (11,8 мг/мл).

CaP/CS/ЦФТ композити. Для отримання суспензії готували 6% CS в 1% оцтовій кислоті, 0,5 М розчин ацетату кальцію, 0,3 М розчин дигідроортофосфату натрію та 1% розчин TPP. 6% CS в 1% оцтовій кислоті додавали до 0,5 М ацетату кальцію (рН 6,86), при цьому співвідношення Ca/CS складало 0,45. Суміші струшували у шейкері протягом 3 год (37 °C, 110 об./хв), після чого покропельно диспергували у розчині 0,3 М натрію дигідроортофосфату (рН 8,0), кількість якого була достатньою для утворення та вільного розташування гранул аморфного кальцію фосфату. Через 2 години частина зразків була піддана впливу MW (600W) протягом 75 с (імпульсним впливом — 5 разів по 15 секунд, для запобігання перегрівання реакційної суміші), при цьому кінцева температури суміші досягла 60 °C. Зразки були названі CaP/CS600W. Конвекційне нагрівання при 60 °C було застосовано до іншої частини зразків, які були названі CaP/CS. Після охолодження розчин NaH_2PO_4 замінювали на 1% TPP та витримували 12 годин, що забезпечувало композитам стабільну форму гранул [19].

Навантаження зразків лікарським засобом ЦФТ проводили 2 методами, а саме: додаванням до материнської суміші під час синтезу, або шляхом насичення у водному розчині ЦФТ готових гранул. Концентрація ЦФТ в обох випадках становила 12,5 мг/мл.

Методи

HPLC determination. Дослідження вивільнення лікарських засобів проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням Agilent 1200 з DAD-детектором ($\lambda = 210\text{--}270$ нм) і хроматографічної колонки C18 (Zorbax SB-C18 4,6×150 мм, 5 мкм) за температури навколишнього середовища. Експериментальні зразки, насичені лікарськими засобами, поміщали в 6 мл PBS (фосфатний буферний розчин) при рН 7,2 та інкубували за температури 37 °C при безперервному струшуванні 80 об./хв [18]. PBS — це водний сольовий розчин, що містить дигідрофосфат натрію (10 ммоль/л), хлорид натрію (137 ммоль/л), хлорид калію (2,7 ммоль/л) і дигідрофосфат калію (1,8 ммоль/л) [20].

Вивільнення препаратів контролювали погодинно протягом першої доби, а потім щоденно. Для цього з кожної пробірки відбирали аліквоти 600 мкл PBS, а потім

додавали рівний об'єм свіжого середовища для підтримки постійного початкового об'єму в пробірках [3].

Визначення вивільнення АНА: елюент метанол та 10% крижана оцтова кислота при співвідношенні 10:90, відповідно; швидкість потоку 2 мл/хв.; ізостатичний режим; температура аналітичної колонки 40 °С; об'єм ін'єкції 20 мкл; детектування відбувалося при довжині хвилі 210 нм. Час дослідження проби — 5 хвилин [18].

Визначення вивільнення ЦФТ: елюент 0,05 М ортофосфорна кислота (рН 2,0) та ацетонітрил у співвідношенні 35:65, відповідно; при швидкості потоку 2,0 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а виявлення відбувалося при довжині хвилі 254 нм. Час дослідження проби — 3 хвилини.

Усі експерименти проводили в трьох повторах, і вивільнення лікарського засобу з композитів визначали за калібрувальними кривими. Механізм дифузії ліків із інкапсульованих полімерів визначали за допомогою рівняння Корсмейєра-Пеппаса [21]:

$$M_t/M_\infty = kt^n,$$

де k і n є постійними і відповідно називаються характеристикою композиту та показником дифузії. M_t — кількість препарату, що вивільняється за час t , а M_∞ — кількість препарату в стані рівноваги.

Кумулятивне вивільнення АНА визначали з урахуванням концентрації розчину та кількості відібраної речовини, яка містилась у аліквоті 600 мкл при кожному відборі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В даній роботі було проведено порівняльне дослідження кінетики вивільнення гідрофобного АНА та гідрофільного ЦФТ з матриць на основі природного полімеру CS з вмістом НА. Полімер-апатитні матриці, як потенційні носії лікарських засобів, були синтезовані за різних технологічних умов (конвекційне або MW нагрівання різної потужності), з вмістом фулерену C_{60} , а лікарські засоби були внесені або при синтезі, або шляхом насичення готового продукту.

Часто базові лікарські засоби демонструють профіль вивільнення першого порядку, який називають «вибуховим» вивільненням, тобто вивільнення великої частки препарату на ранній стадії, після чого слідує зниження фізіологічної концентрації препарату [22]. При цьому фармакокінетика виявляє численні екстремальні низькі та високі показники концентрації лікарських засобів, які характеризують нерівномірне вивільнення ліків. Дані процеси можуть призводити до передозування, а отже, мають бути обмежені. Для забезпечення безпечного вивільнення лікарських засобів швидкість надходження препарату до організму має бути постійною протягом певного періоду часу. Такий фармакологічний процес може бути представлений у вигляді кінетичного профілю нульового порядку — лінійної залежності кількості вивільненої речовини від часу [23].

Відомо, що тип лікарського засобу, а також його взаємодія з CS та іншими компонентами матриці, компонентний склад матриці, її пористість та здатність до набрякання відіграють важливу роль у контролі вивільнення ліків.

Так, на Рис. 1 зображені HPLC графіки вивільнення АНА зі складу НА/CS експериментальних зразків, навантажених АНА шляхом насичення при 37 °С протягом 24 годин. Ці зразки представлені в якості систем для пролонгованого вивільнення лікарського засобу. Очевидно, що хімічні реакції під час синтезу та формування гранул зменшили кількість вільних функціональних груп у CS, здатних взаємодіяти з полярними молекулами води та розчинами ліків. Імобілізація препарату на поверхні

композитного матеріалу могла відбуватися під впливом електростатичних сил. Тому поверхня зразка була областю з найвищою концентрацією АНА. Це сприяло вивільненню препарату в перший день.

На Рис. 1 можна виокремити дві основні стадії вивільнення препарату з експериментальних зразків: 1) упродовж першого дня та 2) після першого дня і до кінця вивільнення. Перша фаза характеризується відносно високою швидкістю вивільнення адсорбованого на поверхні АНА. В подальшому вивільнення препарату з усіх експериментальних зразків відбувається практично рівномірно впродовж усього періоду дослідження [18]. Слід зазначити, що матриці на основі CS та HA є важкорозчинними і гранули під час дослідження зберігали механічну стабільність. Фармакокінетика вивільнення з таких зразків в основному визначалася ступенем адсорбції препарату матеріалом і його дифузійним потенціалом.

Особливу увагу було приділено зразкам, синтезованим під дією MW опромінення (Рис. 1 В). Зразок HA/CS300W синтезований під дією найменшої потужності MW демонструє найменш тривале вивільнення, в той час, як час вивільнення лікарського засобу зі зразка HA/CS800W є більшим майже у два рази. Найнижча швидкість вивільнення АНА спостерігається для HA/CS800W, а найвища для контрольного HA/CS. У перші дві години найменша кількість (близько 32%) АНА вивільняється зі зразка HA/CS800W, що є позитивним моментом. В інших зразках вивільнення препарату в перші кілька годин становить близько 45%. На додаток, HA/CS800W показує найтриваліший час вивільнення (912 годин) порівняно з іншими експериментальними зразками (384–336 годин). Цей факт є результатом гідрофобних взаємодій між АНА та компонентами матеріалу, причому вплив MW опромінення сприяє специфічному розташуванню сайтів зв'язування та доступу молекул АНА до цих сайтів [18]. Таким чином, композити можуть бути застосовані для лікування великих дефектів кісткової тканини, що потребують значного часу для відновлення нативної кістки.

Внесення наночастинок фулерену C_{60} до композитної матриці пролонгує час вивільнення та підвищує загальну кількість вивільненого препарату пропорційно його вмісту (порівняно з контрольним HA/CS). Ми припускаємо, що затримка вивільнення препарату зі зразків з вмістом C_{60} є результатом гідрофобних взаємодій між C_{60} і АНА. Таким чином, час вивільнення препарату можна регулювати, змінюючи вміст C_{60} .

Кінетичні розрахунки кінетики вивільнення АНА проводили для етапу рівномірного вивільнення препарату, який відбувається після першої доби, оскільки на першому етапі АНА активно вивільнявся з поверхневого шару. У результаті індекс вивільнення n приймав значення від $n = 0,75$ до $n = 0,82$ (Таблиця 1), демонструючи кінетику дифузії, що не підпорядковується закону Фіка [21].

Аналізуючи отримані дані (Таблиця 1), та виходячи зі значення параметру r , можна зробити висновок про достатньо рівномірний профіль вивільнення АНА. Це також підтверджується параметром n , який близький до 0,8, що для зразків круглої форми свідчить про дифузію, як таку, що не підпорядковується закону Фіка (дифузія PFO). Даний тип вивільнення АНА наближається до моделі нульового порядку, що є золотим стандартом вивільнення лікарських засобів. Якщо порівнювати кінетику вивільнення АНА зі зразків з вмістом фулерену C_{60} з результатами, отриманими для зразків без домішок, то для останніх спостерігається підвищення значення параметру n , що свідчить про більш складний характер дифузії. Вивільнення препарату зі зразків з вмістом фулерену C_{60} контролюється виключно силами дифузії, в той час як з контрольного зразку вивільнення препарату визначається як дифузією препарату, так і деградацією гранул (незначний вплив).

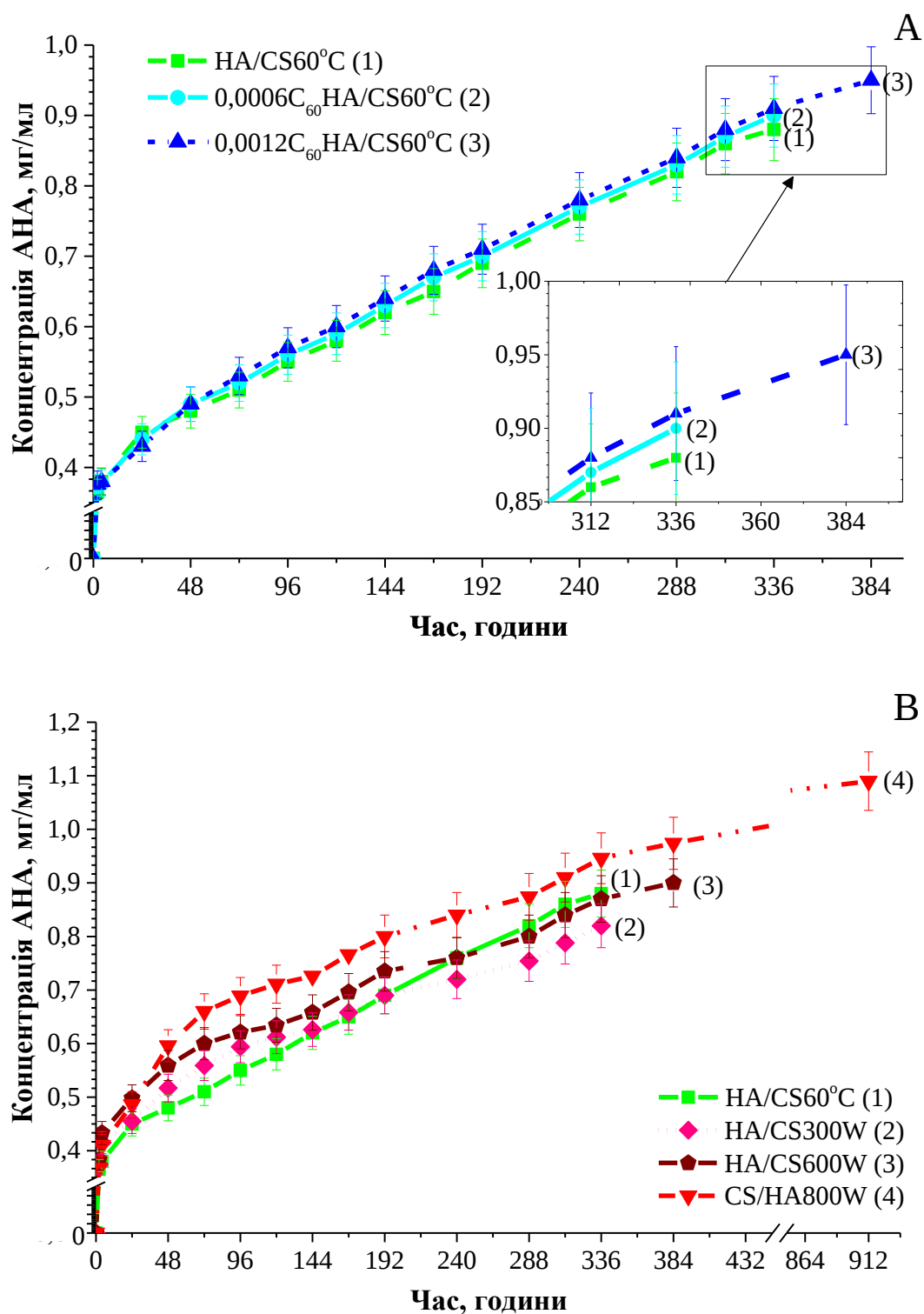


Рис. 1. HPLC графіки вивільнення АНА зі складу HA/CS зразків: А) контрольний зразок без фулерену (HA/CS) та зразки з додаванням фулерену C₆₀: (зразки 0,0012C₆₀HA/CS та 0,0006C₆₀HA/CS), синтезовані конвекційним методом (позначка 60°C); В) синтезовані мікрохвильовим методом (потужність 300, 600 та 800W). *p<0.05

Fig. 1. HPLC graphs of ANA release from the HA/CS samples: A) control sample without fullerene (HA/CS) and with the addition of fullerene C₆₀: (samples 0.0012C₆₀HA/CS and 0.0006C₆₀HA/CS), synthesized by the convection method (60°C); B) samples synthesized by the microwave method (power 300, 600 and 800W). *p<0.05

Для порівняння, у роботі [16] вивільнення АНА з CS-PVP (полівінілпіролідон) матриць, зшитих МРТМС ((3-меркаптопропіл)триметроксисілан), відбувалося впродовж всього 100 хвилин, та теж підпорядковувалося моделі Корсмейера-Пеппаса (Таблиця 1, зразок СР-II).

На Рис. 2 наведено графіки вивільнення ЦФТ зі складу CaP/CS композитів. Як було вище сказано, було застосовано дві методики навантаження зразків ЦФТ, а саме 1) під час синтезу, шляхом додавання порошку ЦФТ до суміші компонентів та 2) після остаточного висихання сформованих гранул шляхом насичення у розчині ЦФТ. Як бачимо, графіки демонструють два кардинально різні профілі вивільнення.

Таблиця 1. Параметри розрахунку модулі Корсмейера-Пеппаса для розроблених гібридних композитів

Table 1. Korsmeyer-Peppas modulus calculation parameters for developed hybrid composites

Зразок	Параметри кінетичної моделі		
	k	n	r^*
1	2	3	4
АНА			
HA/CS	0,080	0,680	0,996
HA/CS300W	0,087	0,655	0,996
HA/CS600W	0,111	0,591	0,998
HA/CS800W	0,115	0,636	0,998
0,0006C ₆₀ HA/CS	0,067	0,757	0,999
0,0012C ₆₀ HA/CS	0,059	0,818	0,999
CP-II [16]	-	0,932	0,993
ЦФТ			
CaP/CS_ Saturation**	10,345	1,042	0,997
CaP/CS600W_ Saturation	10,038	0,928	0,979
CaP/CS_ Synthesis**	33,212	0,540	0,887
CaP/CS600W_ Synthesis	21,557	0,700	0,875
GA-TG-cl-poly(AAm) [15]	1,387	0,65	0,997

* r — коефіцієнт кореляції ($-1 \leq r \leq 1$).

** — навантаження лікарським засобом при синтезі або шляхом насичення

Так, ЦФТ, введений шляхом насичення, вивільняється активно протягом перших годин ($> 30\%$), що є «вибуховим» вивільненням. На противагу цьому, протягом перших двох діб вивільняється близько 10% від загальної кількості ЦФТ, введеного до складу композиту під час синтезу. Зразки, синтезовані під дією MW опромінення, є більш пористими, ніж синтезовані конвекційним методом. Тому під час насичення більш розвинена поверхня здатна адсорбувати та надалі вивільняти більшу кількість лікарського засобу. Логічним є швидше вивільнення зі зразків CaP/CS600W. У разі додавання ЦФТ під час синтезу спостерігається протилежна динаміка вивільнення ЦФТ. Очевидно, це пов'язано з утворенням більш міцних зв'язків між молекулами композиту та ЦФТ, спричинене саме дією MW. Таким чином, вивільнення ЦФТ з CaP/CS600W є більш повільним.

На ділянці 48–72 години відбувається стрімкий ріст вивільненого ЦФТ внаслідок руйнування матриці. Ефекти руйнування поверхневих шарів матриці в розчині PBS присутні в обох випадках, але мають різний вплив на динаміку вивільнення за рахунок різного розподілу молекул лікарського засобу всередині та на поверхні композиту. Процеси адсорбції ЦФТ композитом під час насичення сприяють формуванню високої

концентрації лікарського засобу на поверхні гранул, і нижчої — в об'ємі. Таким чином, процес руйнування матриці ЦФТ насичених композитів демонструє відсутність стрибкоподібних ділянок після початку деградації.

Коефіцієнт кореляції r має вищі значення для методу насичення, але при цьому значення параметрів кінетичної моделі є значно вищими й відповідають дифузії, що не підпорядковується закону Фіка.

Для порівняння у роботі [15] показано, що кількісне вивільнення антибіотика ЦФТ з інкапсульованого гідрогелю GA-TG-cl-poly(AAm), яке відбувалось у буферному розчині при pH 7,4, було більшим, ніж при pH 2,2. Дифузія препарату не відповідала закону Фіка, що витікало зі значень показника дифузії 0,53 у буфері з pH 2,2 та 0,65 у буфері з pH 7,4. Час вивільнення складав 1440 хвилин (1 доба).

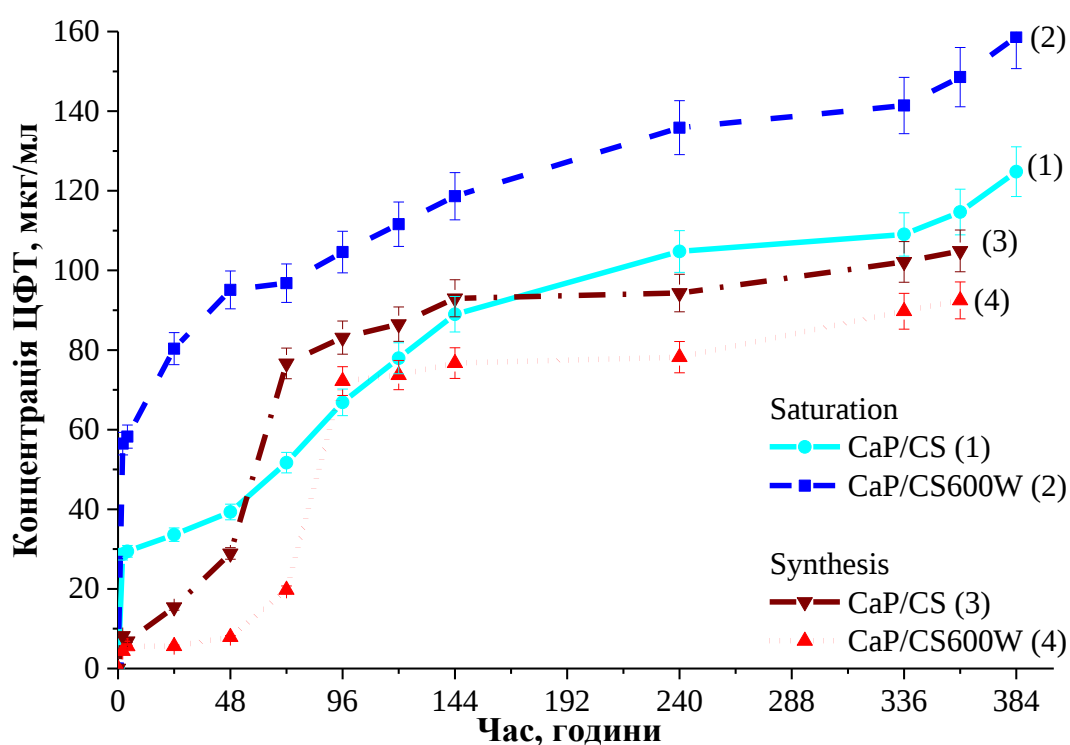


Рис. 2. HPLC графіки вивільнення ЦФТ зі складу CaP/CS зразків, синтезованих конвекційним та мікрохвильовим методом. * $p < 0.05$

Fig. 2. HPLC graphs of CFT release from CaP/CS samples synthesized by convection and microwave methods. * $p < 0.05$

Таким чином, отримані CaP/CS композити виконують функцію носія лікарського засобу з пролонгованим його вивільненням, але проблема вдосконалення кінетики вивільнення все ще залишається. Очевидно, що цього можна досягти шляхом модифікації структури, наприклад, внесенням певної концентрації домішок наночастинок, а також підвищенням пористості композитів.

ВИСНОВКИ

У роботі досліджено вплив факторів, що здатні впливати на кінетику вивільнення лікарських засобів, а саме: метод синтезу композитів (класичний чи MW), методика

внесення лікарського засобу (насичення чи під час синтезу), наявність та кількісний вміст неорганічних наночастинок.

На відміну від методу внесення лікарських засобів під час синтезу (вивільнення відбувається поступово), метод насичення композитів лікарськими препаратами демонструє нерівномірне вивільнення з ділянкою швидкого зростання на початку дослідження, що відповідає поверхнево-адсорбованому ЦФТ.

Дослідження HPLC довело прямо пропорційну залежність між вмістом C_{60} та тривалістю вивільнення АНА: зміна вмісту C_{60} дозволяє регулювати час вивільнення препарату. Синергічна дія CS і C_{60} забезпечує профіль вивільнення АНА, який відповідає розрахованому коефіцієнту кореляції ($r = 0,99$), та параметрам моделі Корсмейєра-Пеппаса ($n = 0,75\text{--}0,82$), що близькі до профілю кінетичного вивільнення нульового порядку.

Внесення ЦФТ на етапі синтезу гібридних СаР-вмісних матеріалів суттєво покращує кінетику вивільнення препарату впродовж перших 5 діб. Після 72 годин кількість вивільненого лікарського засобу суттєво збільшується, що означає початок деградації поверхневих шарів матриці-носія лікарського засобу. Найкращі параметри моделі Корсмейєра-Пеппаса ($n = 0,93\text{--}1$) були отримані для композитів синтезованих під дією MW випромінювання, з ЦФТ внесеним шляхом насичення.

Таким чином, параметри кінетичної моделі та динаміка вивільнення лікарських засобів з композитів на основі хітозанової матриці суттєво залежать від наступних чинників: співвідношення полімеру та вмісту наночастинок (кальцій фосфатів/фулерену), структури композиту та методу внесення лікарського засобу.

ПОДЯКА

Дослідження виконано за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України [грант № 0122U000775, 2022-2024].

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Mariia Kumeda  <https://orcid.org/0000-0002-8480-9223>

Liudmyla Sukhodub  <https://orcid.org/0000-0002-9350-5766>

Leonid Sukhodub  <https://orcid.org/0000-0002-1559-0475>

REFERENCES

1. Liu Z-L, Jia Q-Y, Li X-D, Li S-P, Shen J, Lin J, et al. Synthesis of hollow mesoporous HAp-Au/MTX and its application in drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2020;586:124231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124231>
2. Fosca M, Rau J V., Uskoković V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. *Bioact Mater.* 2022;7:341–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.032>
3. Sukhodub LB, Kumeda MA, Sukhodub LF, Prylutskyi YI. Fullerene C_{60} -containing hydroxyapatite/polymer polyelectrolyte composite for dental applications. In: Pogrebnjak, A., Pogorielov, M., Viter, R. (eds) *Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors (NAP-2019)*. Springer Proceedings in Physics. Vol. 244. Springer, Singapore; 2020. p. 129–37. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3996-1_13
4. Lahiri D, Ghosh S, Agarwal A. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for orthopedic application: A review. *Materials Science and Engineering: C.* 2012;32:1727–58. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.010>
5. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, et al. C_{60} in water: Nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol.* 2005;39:307–16. <https://doi.org/10.1021/es048099n>
6. Grebinyk A, Grebinyk S, Prylutska S, Ritter U, Matyshevska O, Dandekar T, et al. C_{60} fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* 2018;124:319–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.022>

7. Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJJ. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size. *Environ Sci Technol.* 2006;40:4360–6. <https://doi.org/10.1021/es0603655>
8. Zarrintaj P, Seidi F, Youssefi Azarfam M, Khodadadi Yazdi M, Erfani A, Barani M, et al. Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. *Compos B Eng.* 2023;258:110701. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110701>
9. Krishnaswami V, Rajan E, Dutta G, Muruganantham S, Sugumaran A, SA JR. Chitosan mediated smart photodynamic therapy based novel drug delivery systems- a futuristic view. *Carbohydr Polym Technol Appl.* 2024;7:100510. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100510>
10. Hwang S-J, Lee J-S, Ryu T-K, Kang R-H, Jeong K-Y, Jun D-R, et al. Alendronate-modified hydroxyapatite nanoparticles for bone-specific dual delivery of drug and bone mineral. *Macromol Res.* 2016;24:623–8. <https://doi.org/10.1007/s13233-016-4094-5>
11. Soares F, Ribeiro N, Baião A, Torres PMC, Sarmento B, Olhero SM. Sustained drug release from sintering-free calcium phosphate-based scaffolds. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2023;88:04906. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104906>
12. Duceac LD, Luca AC, Mitrea G, Banu EA, Ciuhodaru MI, Ciomaga I, et al. Ceftriaxone intercalated nanostructures used to improve medical treatment. *Materiale Plastice.* 2018;55(4):613–5. <https://doi.org/10.37358/mp.18.4.5086>
13. Shrimali JD, Patel H V., Gumber MR, Kute VB, Shah PR, Vanikar A V., et al. Ceftriaxone induced immune hemolytic anemia with disseminated intravascular coagulation. *Indian Journal of Critical Care Medicine* 2013;17. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.123465>
14. Hossein abadi AR, Farhadian N, Karimi M, Porozan S. Ceftriaxone sodium loaded onto polymer-lipid hybrid nanoparticles enhances antibacterial effect on gram-negative and gram-positive bacteria: Effects of lipid - polymer ratio on particles size, characteristics, in vitro drug release and antibacterial drug efficacy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;63:102457. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102457>
15. Singh B, Dhiman A, Kumar S. Polysaccharide gum based network hydrogels for controlled drug delivery of ceftriaxone: Synthesis, characterization and biomedical evaluations. *Results Chem.* 2023;5:100695. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100695>
16. Raza MA, Gull N, Lee SW, Seralathan KK, Park SH. Development of stimuli-responsive chitosan based hydrogels with anticancer efficacy, enhanced antibacterial characteristics, and applications for controlled release of benzocaine. *J Ind Eng Chem.* 2022;109:210–20. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.004>
17. Ritter U, Prylutsky YI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2015;23:530–34. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
18. Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutska SV, Deineka V, Prylutsky YI, et al. C₆₀ fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. *Carbohydr Polym.* 2019;223:115067. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115067>
19. Sukhodub L, Kumeda M, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasieka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun.* 2022;31:103696. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103696>
20. Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutsky YI, Pogorielov M V., Evstigneev MP, et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability. *Prog Biomater.* 2020;9:1–14. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00127-2>
21. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 1983;15:25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
22. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Controlled Release.* 2001;73:121–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6)
23. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(3):217–23.

KINETIC ANALYSIS OF DRUG RELEASE FROM BIODEGRADABLE NANOPARTICLE-MODIFIED MATERIALS BASED ON CHITOSAN

M. O. Kumeda* , L. B. Sukhodub , L. F. Sukhodub *Laboratory Bionanocomposite, Sumy State University, 126 Kharkivska St., Sumy, 40006, Ukraine***Corresponding author: mariyakumeda@gmail.com**Submitted June 12, 2024; Revised October 30, 2024;**Accepted November 12, 2024*

Background: The problem of drug delivery to the tissue-damaged area of the human body remains relevant. Hydroxyapatite (HA), as one of the best known calcium phosphate (CaP) compounds, is used as an inorganic component of composite materials for drug loading. The organic components in composite materials are biopolymers such as alginate, agarose, chitosan (CS), collagen, and gelatin. Selected C₆₀ nanoparticles are widely used as antibacterial agents and can strengthen the structure of composites. Microwave (MW) irradiation is an exposure method that shortens the synthesis time by significantly increasing the number of nucleation centers, which results in the reducing the size of the crystallites formed, which affects the adsorption capacity of the product.

Objectives: Most forms of drug delivery systems demonstrate rapid release of ceftriaxone (CFT) and anesthesin (ANA) within 2 days, characterized by a "burst release" that may cause overdose in the first hours of use. The aim of this work was to investigate and compare the drug release kinetics from convectionally and MW-synthesized CS matrices modified with HA, multiphasic CaP, and fullerene C₆₀ nanoparticles for long-term bone tissue regeneration.

Materials and methods: The study was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent 1200 device with a DAD detector ($\lambda = 210\text{--}270$ nm) and a C18 chromatographic column (Zorbax SB-C18 4.6×150 mm, 5 μm) at ambient temperature.

Results: HA is a good adsorbent, but a poorly soluble substance, so the pharmacokinetics of ANA release was mainly determined by the degree of adsorption of the drug on the surface of the material and its diffusion potential. CS and C₆₀ in the composition provide a prolonged release of ANA for up to 18 days. The release of CFT from CaP/CS matrices depends on the method of its introduction into the composite - during synthesis or saturation after synthesis. The saturation method is characterized by a fast release range of 24–48 hours, and adding during synthesis delays active release to 48–72 hours (start of degradation). The release index took values from $n = 0.56$ to $n = 0.92$, which corresponds to the release kinetics that does not follow Fick's law, and close to the first-order release kinetics model.

Conclusions: Synthesized composites based on a CS matrix modified with nanostructured CaP particles and fullerene C₆₀ are potential carriers of CFT and ANA with the function of their long-term release in areas of bone tissue injury.

KEYWORDS: chitosan; hydroxyapatite; fullerene C₆₀; drug release; nanoparticles.