



**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM
MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
ZAKŁAD FARMACJI STOSOWANEJ**

Dr n. farm. Emilia Szymańska

Zastosowanie modyfikowanych fizycznie chitozanów do projektowania
nowoczesnych form farmaceutycznych do podania miejscowego

Autoreferat

(załącznik 3)

Białystok 2022

Spis treści

1. DANE PERSONALNE	3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE	3
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH	3
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY	4
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3. AUTOREFERAT WRAZ Z OMÓWIENIEM OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
4.3.1. Wprowadzenie	5
4.3.2. Założenia i cele badawcze	8
4.3.3. Optymalizacja technologii suszenia rozpyłowego mikrocząstek z glutaminianu chitozanu oraz ocena właściwości pod kątem zastosowania jako nośniki mikrobicydu do podania dopochwowego	9
4.3.4. Optymalizacja profilu uwalniania substancji aktywnej z chitozanowych mikrocząstek po wprowadzenia czynnika sieciującego z zastosowaniem narzędzi planowania statystycznego	14
4.3.5 Ocena jakości i możliwości zastosowania nanowłókien chitozanowych otrzymanych metodą rodmuchu roztworu polimeru w technologii farmaceutycznej	15
4.4. PODSUMOWANIE	21
4.5. LITERATURA	22
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ	24
6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ I SZTUKĘ	26
6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA	26
6.1.1. Kształcenie przeddyplomowe	26
6.1.2. Kształcenie podyplomowe	26
6.1.3. Opieka naukowa nad studentami	26
6.1.4. Recenzje prac magisterskich	27
6.2. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki	27
6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA	28
7. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ I OSIĄGNIĘCIA ZAWODOWE	28

7.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora	28
7.2. Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora	29
7.3. Doskonalenie zawodowe	31
7.4. Doskonalenie naukowe	31
7.5. Doskonalenie dydaktyczne	32
7.6. Nagrody i wyróżnienia	32

1. DANE PERSONALNE

Emilia Szymańska

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE

- 2008** Dyplom magistra farmacji, UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej.

Tytuł pracy: *“Wpływ szoku septycznego na aktywność atypowych receptorów beta-adrenergicznych w układzie krążenia szczura”*
Promotor: prof. dr hab. Barbara Malinowska
- 2008** Prawo wykonywania zawodu farmaceuty na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej – uprawnienie (nr 01008135) wydane uchwałą Okręgowej Rady Aptekarskiej w Białymstoku z dnia 16.06.2008 r.
- 2015-2016** Dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Farmacja przemysłowa” UNIWERSYTET JAGIEŁOŃSKI, Collegium Medicum
- 2016** Dyplom doktora nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej.
Tytuł pracy: *“Ocena przydatności chitozanu jako substancji pomocniczej do sporządzania postaci leku z klotrimazolem”*
Promotor: prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Winnicka

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

01.04.2008 – 30.09.2017: asystent badawczo – dydaktyczny, Zakład Farmacji Stosowanej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

01.10.2017 – do chwili obecnej: adiunkt badawczo – dydaktyczny, Zakład Farmacji Stosowanej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Zastosowanie modyfikowanych fizycznie chitozanów do projektowania nowoczesnych form farmaceutycznych do podania miejscowego

4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 5 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) o łącznym **IF 32,218 (MNiSW 540)**. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz kopie tych publikacji zostały umieszczone w Załączniku 5. Sumaryczny impact factor dorobku naukowego wg JCR **IF 110,531 (MNiSW 2156)**.

(współczynnik oddziaływania IF podany za rok opublikowania pracy; punkty MNiSW według wykazu Ministra Nauki Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 grudnia 2021r.)

[P1] Szymańska E, Czarnomysy R, Jacyna J, Basa A, Wilczewska AZ, Markuszewski M, Winnicka K. Could spray-dried microbeads with chitosan glutamate be considered as promising vaginal microbicide carriers? The effect of process variables on the *in vitro* functional and physicochemical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 568: 118558

IF = 4,845; MNiSW = 100

[P2] Szymańska E, Krzyżowska M, Cal K, Mikolaszek B, Tomaszewski J, Wołczyński S, Winnicka K. Potential of mucoadhesive chitosan glutamate microparticles as microbicide carriers - antiherpes activity and penetration behavior across the human vaginal epithelium. *Drug Delivery* 2021, 28: 2278

IF = 6,819; MNiSW = 100

[P3] Szymańska E, Woś-Latosi K, Jacyna J, Dąbrowska M, Potaś J, Markuszewski M, Winnicka K. The correlation between physical crosslinking and water-soluble drug release from chitosan-based microparticles. *Pharmaceutics* 2020, 12: 17 pp.

IF = 6,321; MNiSW = 100

[P4] Szymańska E, Wojasiński M, Czarnomysy R, Debowska R, Łopianiak I, Adasiewicz K, Ciach T, Winnicka K. Chitosan-enriched solution blown spun poly(ethylene oxide) nanofibers with poly(dimethylsiloxane) hydrophobic outer layer for skin healing and regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23: 22 pp.

IF = 6,208 ; MNiSW = 140

[P5] Szymańska E, Wojasiński M, Dąbrowska J, Krzyżowska M, Nowicka M, Ciach T, Winnicka K. Chitosan-poly(ethylene oxide) nanofibrous mat as a vaginal platform for tenofovir disoproxyl fumarate – the effect of vaginal pH on drug carrier performance. *International Journal of Biological Macromolecules* 2022

IF = 8,025; MNiSW = 100

4.3. AUTOREFERAT WRAZ Z OMÓWIENIEM OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4.3.1. Wprowadzenie

Pojęcie forma farmaceutyczna określa postać jaką nadano lekowi, umożliwiającą jego bezpośrednie podanie w celu osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego, diagnostycznego lub profilaktycznego. Pod tym pojęciem można rozumieć także zmodyfikowaną fizycznie postać substancji aktywnej, najczęściej z wykorzystaniem substancji pomocniczych w celu zapewnienia pożądanых cech farmakokinetycznych i/lub aplikacyjnych. Zadaniem form farmaceutycznych jest nie tylko ochrona substancji aktywnej przed rozkładem czy ograniczenie jej działań niepożądanych, ale również szeroko rozumiana poprawa akceptowalności leku przez pacjenta poprzez wygodniejszą aplikację, zmniejszenie częstości stosowania, czy ułatwienie odmierzania dawki leku. Odpowiednio dobrana postać leku do indywidualnych potrzeb i wymagań pacjenta stanowi ważny element skuteczności leczenia.

W chwili obecnej dąży się do większego zróżnicowania oraz doskonalenia postaci leku, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju choroby, stanu pacjenta oraz jego wieku. Kierunki rozwoju nowoczesnych form farmaceutycznych koncentrują się na modyfikacji szybkości i miejsca działania leku, w szczególności na opracowaniu form szybko działających, postaci o kontrolowanym uwalnianiu, lub nośników, które w sposób celowany przetransportują substancję leczniczą do określonej części organizmu. Niezależnie od przeznaczenia, nadrzędny cel stanowi poprawa dostępności biologicznej i skuteczności terapeutycznej leku. Spośród nowoczesnych form farmaceutycznych na szczególną uwagę zasługują układy wielozbiornikowe oraz nośniki w rozproszeniu nano.

Termin układy wielozbiornikowe (inaczej wielokompartментowe) oznacza, że dawka substancji leczniczej podzielona jest na wiele mniejszych zbiorników. Przykładem nośników wielokompartментowych są mikrocząstki (mikrosfery, mikrokapsułki) – na ogół sferyczne cząstki o średnicy nie przekraczającej 500 µm. W mikrosferach substancja lecznicza jest inkorporowana (rozpuszczona lub zawieszona) w polimerowej matrycy. W budowie mikrokapsułek można natomiast wyróżnić polimerową otoczkę oraz rdzeń z substancją aktywną. Mikrocząstki stanowią przedmiot szczególnego zainteresowania technologów z uwagi na zdolność do przenoszenia różnorodnych, często nietrwałych substancji oraz możliwość uzyskania przedłużonego profilu uwalniania leku [1]. W literaturze odnaleźć

można liczne prace naukowe dotyczące ich wykorzystania jako nośników leku do podania doustnego [2], na błony śluzowe [3-4], czy do oka [5]. Na rynku farmaceutycznym dostępne są preparaty w postaci mikrosfer do podania pozajelitowego [6-7].

Nośniki w rozproszeniu nano to nanomateriały o różnorodnym kształcie, których wielkość wynosi od 1 do 300 nm. Poszczególne struktury mogą występować w stanie swobodnym lub w postaci agregatów (czy aglomeratów) i organizować się w formy jedno-, dwu- lub wielowymiarowe. Nanonośniki stwarzają możliwość celowanego dostarczenia substancji aktywnej do określonego narządu, tkanki czy komórki. W założeniu ułatwiają one pokonywanie barier komórkowych i lokalizację leku precyzyjnie w miejscu objętym stanem chorobowymi. Przykładem nanomateriałów wykorzystywanych w technologii farmaceutycznej są liposomy, dendryмеры oraz nanowłókna [7-10].

Nanowłókna to materiały o rozbudowanej powierzchni i wysokiej porowatości. Mogą przyjmować różnorodne kształty, np. cienkiego filmu o grubości do ok. 200-300 μm . Do zaawansowanych technik otrzymywania nanowłókien należą metoda elektroprzędzenia (ang. *electrospinning*) oraz rozdmuchu roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS) [11-12]. Proces elektroprzędzenia opiera się formowaniu włókien w polu elektrycznym, w którym następuje rozciąganie kropli dyspersji polimeru w nitki przy jednoczesnym odparowaniu rozpuszczalnika. W metodzie SBS przędzenie wodnej dyspersji materiału polimerowego następuje w wyniku działania sprężonego powietrza o dużej prędkości opływającego strumień roztworu polimeru. Nanowłókna znajdują zastosowanie w inżynierii tkankowej między innymi jako rusztowania (ang. *scaffolds*) sprzyjające procesom naprawczym tkanek i narządów, np. regeneracji tkanki chrzęstnej czy kostnej [13]. Badane są również pod kątem wykorzystania jako materiały opatrunkowe ze względu na wysoką przepuszczalność gazów oraz zdolność pęcznienia i pochłaniania wydzieliny z sączącej się rany [14]. Z uwagi na rozbudowaną powierzchnię oraz właściwości tworzenia hydrożelowej matrycy w środowisku wodnym, nanowłókna stanowią obiecujący materiał w technologii nośników leku o kontrolowanym profilu uwalniania substancji czynnej [15-16]. Warto wspomnieć, że w ostatnim czasie na rynku światowym pojawił się innowacyjny materiał o strukturze nanowłókien otrzymany techniką elektroprzędzenia. Opracowany przez izraelską firmę produkt AVflo[®] wykorzystywany jest do nieinwazyjnego zabiegu hemodializy u pacjentów z niewydolnością nerek [10].

Rozwój nowych form farmaceutycznych jest możliwy nie tylko dzięki innowacyjnym rozwiązaniom technologicznym, ale również nowym substancjom pomocniczym. Obszerą grupę surowców pomocniczych wykorzystywanych przy formulacji leku stanowią związki wielkocząsteczkowe, tzw. polimery. Spośród nich niestabnym zainteresowaniem w technologii farmaceutycznej ciecżą się polimery chitozanowe, polikationowe substancje zbudowane z podjednostek N-acetylo-D-glukozaminy i D-glukozaminy połączonych wiązaniem β - (1,4) – glikozydowym. Substancję wyjściową do produkcji chitozanów stanowi chityna, będąca materiałem budulcowym szkieletu morskich bezkręgowców, owadów, oraz ścian komórkowych grzybów i bakterii. Chitozany charakteryzują się biogodnością i

biodegradowalnością. W organizmie ulegają degradacji enzymatycznej przez m.in. lizozym czy hemicelulazy do nietoksycznych oligosacharydów, które mogą być następnie wydalone lub wykorzystane, m.in do syntezy endogennych glukozaaminoglikanów [17].

Chitozany określane są terminem polimery wielofunkcyjne, z uwagi na ich właściwości biologiczne, tj. zdolność rozluźniania połączeń międzykomórkowych, czy właściwości immunomodulujące [17-18]. Ze względu na mukoadhezyjność, czyli zdolność oddziaływania z błoną śluzową, polimery te wydają się niezwykle przydatną substancją w technologii postaci leku do podania miejscowego [19]. W szczególności zwraca się uwagę na aktywność przeciwdrobnoustrojową chitozanów *per se* polegającą między innymi na oddziaływaniu między dodatnio naładowanym polimerem a fosfolipidami błony komórkowej drobnoustroju, czy zdolności do tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali niezbędnymi do wzrostu komórek [20]. W ostatnich latach badania koncentrują się także na aktywności przeciwwirusowej tej grupy polimerów i potencjale ich wykorzystania jako nośnik leków przeciwwirusowych, czy adjuwant w technologii szczepionek [21]. Mechanizm działania jest złożony i związany z bezpośrednim wiązaniem chitozanu z powierzchnią wirusa prowadzącym do zaburzeń struktury i przepuszczalności kapsydu białkowego. Badania wskazują również na blokowanie przez chitozan transferu materiału genetycznego do komórki poprzez wiązanie i odłączanie wirusowego ogona [22]. Warto w tym miejscu wspomnieć o nowej technologii Novochizol™ opartej na nanosferach wykonanych z usieciowanego chitozanu. Nośnik ten występujący w postaci mikronizowanego proszku został opatentowany przez szwajcarską firmę biotechnologiczną do zastosowań diagnostycznych lub leczniczych [23]. Obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych u pacjentów z ciężkim przebiegiem zakażeń COVID-19 jako platforma dla leków skierowanych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2. W badaniach wykazano m.in. że po podaniu wziewnym, nanosfery wiążą się z powierzchnią błony śluzowej dróg oddechowych, a następnie uwalniają lek na drodze stopniowej dyfuzji i degradacji polimerowej matrycy [22].

Ważną cechą chitozanów jest ich zdolność do aktywacji płytek krwi i inicjowanie kaskady procesu krzepnięcia. Z uwagi na wspomniane właściwości hemostatyczne, ta grupa biopolimerów znalazła zastosowanie w produkcji opatrunków i środków hamujących krwawienie [24]. W badaniach potwierdzono ponadto korzystny wpływ chitozanów na układ immunologiczny m.in. poprzez aktywację makrofagów i neutrofili czy pobudzenie wydzielania cytokin przeciwzapalnych [25]. Zwraca się również uwagę na ich korzystne właściwości regeneracyjne związane ze stymulacją procesu ziarninowania i reepitalizacji naskórka [26].

Na rynku dostępnych jest wiele odmian chitozanu różniących się m.in. masą cząsteczkową, czy stopniem deacetylacji – parametrami decydujących o jego cechach fizykochemicznych i biologicznych. Pomimo licznych zalet, wysoka różnorodność właściwości biopolimeru oraz brak ujednoliconych wymagań dotyczących jakości tej grupy surowców ogranicza ich praktyczne wykorzystanie w farmacji i medycynie. Należy podkreślić, że modyfikacja fizyczna chitozanu wskutek zastosowanego procesu technologicznego, jak również obecność

dodatkowych substancji pomocniczych może modulować (nasilać lub osłabiać) jego aktywność biologiczną. Wadą polimeru jest również jego ograniczona rozpuszczalność w środowisku wodnym. Chitozany w postaci niemodyfikowanej rozpuszczają się jedynie w roztworach o kwaśnym pH poniżej jego stałej dysocjacji (pK_a ok. 6.3). Należy jednak podkreślić, że pochodne np. w postaci soli (t.j. chlorowodorek czy glutaminian) charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Pomimo, iż chitozany należą do surowców wrażliwych na czynniki środowiskowe i technologiczne, prace nad wpływem modyfikacji fizycznych i chemicznych tej grupy biopolimerów oraz ich aplikacyjnym zastosowaniem w technologii farmaceutycznej są podejmowane przez liczne ośrodki badawcze na świecie.

4.3.2. Założenia i cele badawcze

Rozwój nowoczesnych postaci leku o pożądanym cechach farmakokinetycznych i aplikacyjnych jest możliwy dzięki zastosowaniu polimerów wielofunkcyjnych. Chitozany stanowią grupę naturalnych biopolimerów o polikationowym charakterze i unikalnych właściwościach biologicznych. Ze względu na zdolność oddziaływania z błoną śluzową w pracach badawczych wykorzystywane są zwłaszcza do opracowywania form farmaceutycznych do podania miejscowego. Z powodzeniem stosowane są w technologii materiałów opatrunkowych, preparatów kosmetycznych i suplementów diety. Zróżnicowana struktura tej grupy polimerów uwarunkowana m.in. masą cząsteczkową i stopniem deacetylacji utrudnia natomiast ich praktyczne wykorzystanie jako surowce farmaceutyczne. Istotne zatem jest zbadanie znaczenia modyfikowanych fizycznie chitozanów w projektowaniu nośników leku do podania miejscowego.

Pracę realizowano w dwóch głównych wątkach badawczych:

- projektowanie kompozycji farmaceutycznych opartych o unikalne połączenie substancji aktywnej i chitozanu z wykorzystaniem nowoczesnych technik farmaceutycznych (metody suszenia rozpyłowego oraz rozdmuchu roztworu polimeru) oraz ocena wpływu procesów technologicznych na właściwości fizykochemiczne i biofarmaceutyczne zaprojektowanych postaci leku;
- określenie właściwości biologicznych modyfikowanych strukturalnie chitozanów w opracowanych nośnikach dla substancji przeciwwirusowej do podania dopochwowego oraz w materiałach opatrunkowych o właściwościach regenerujących.

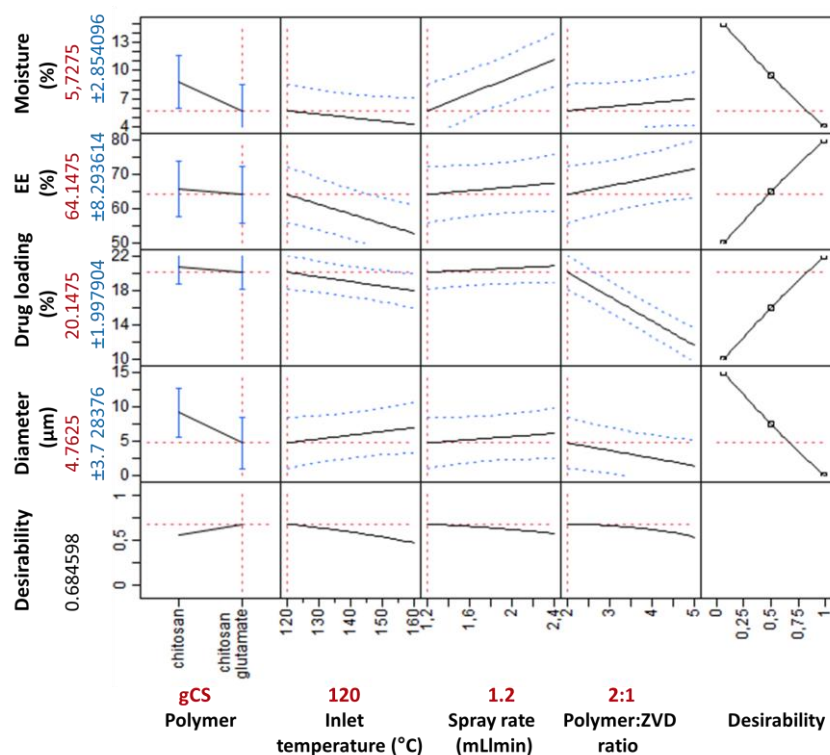
Badania przeprowadzone w oparciu o dwa główne aspekty (technologiczny i biofarmaceutyczny) umożliwiły pogłębienie i uporządkowanie wiedzy w zakresie wpływu procesów technologicznych na modulowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych chitozanu, rozszerzenie danych dotyczących bezpieczeństwa stosowania nowoczesnych nośników leku oraz roli chitozanu jako adjuwanty potęgującego działanie farmakologiczne leków.

4.3.3. *Optymalizacja technologii suszenia rozpyłowego mikrocząstek z glutaminianu chitozanu oraz ocena właściwości pod kątem zastosowania jako nośniki mikrobicydu do podania dopochwowego*

Celem podjętych w pierwszym etapie badań było opracowanie technologii otrzymywania wielozbiornikowych form leku w postaci mikrocząstek z substancją przeciwwirusową do podania dopochwowego. Wyniki zawarłam w artykule opublikowanym w roku 2019 [P1]. Modelową substancję – zydowudynę, należącą do inhibitorów odwrotnej transkryptazy, wytypowano z uwagi na potencjał jej wykorzystania jako mikrobicyd w zapobieganiu infekcji wirusowych przenoszonych drogą płciową. Mikrobicydy to grupa związków zapewniających miejscową ochronę przed przenoszeniem się czynników patogennych, będąca ważnym elementem strategii Światowej Organizacji Zdrowia dążącej do ograniczenia ilości infekcji przenoszonych drogą płciową [27]. Na przestrzeni kilkunastu lat zbadano możliwości wykorzystania wielu różnorodnych substancji jako mikrobicydy, w tym środków zakwaszających, polimerów wielkocząsteczkowych, związków pochodzenia naturalnego, czy wspomnianych inhibitorów odwrotnej transkryptazy [28]. Kluczowe w tej dziedzinie wydaje się opracowanie innowacyjnej postaci farmaceutycznej dla mikrobicydu [29]. Zastosowanie w tym celu chitozanu o właściwościach mukoadhezyjnych i immunomodulujących mogłoby nie tylko wydłużyć czas przylegania leku do błony śluzowej, ale również spotęgować działanie farmakologiczne leku.

W badaniach przedstawionych w pracy P1 wykorzystano wysokiej czystości glutaminian chitozanu, rozpuszczalną w wodzie pochodną polimeru o stopniu deacetylacji 80% oraz masie cząsteczkowej 232 kDa. Dla porównania użyto także chitozan niemodyfikowany o porównywalnych wartościach masy cząsteczkowej i stopnia deacetylacji, powszechnie stosowany w technologii suszenia rozpyłowego [30]. Do otrzymania mikrocząstek wykorzystano jednoetapowy proces suszenia rozpyłowego. W ocenie mikrocząstek szczególnie istotne było zbadanie wpływu parametrów technologicznych na wydajność procesu i efektywność zamykania zydowudyny w chitozanowej matrycy. Z uwagi na trudności w uzyskaniu produktu o pożądanych właściwościach zdecydowano o zastosowaniu statystycznych narzędzi planowania doświadczeń (ang. *Design of Experiments*, DOE). Tę część pracy eksperymentalnej realizowano we współpracy z Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Istotą DOE jest lepsze zrozumienie rozpatrywanego procesu poprzez wyznaczenie modelu matematycznego i określenie zależności pomiędzy zmiennymi zależnymi (właściwościami produktu) i niezależnymi (parametrami procesu). Jako czynniki niezależne wyznaczono stężenie i szybkość przepływu roztworu polimeru, stosunek ilości polimeru do leku, temperaturę suszenia oraz obecność etanolu jako dodatkowego współrozpuszczalnika. Celem było otrzymanie mikrocząstek w postaci homogennego, sykiego proszku o niskiej zawartości wilgoci przy wydajności procesu nie mniejszej niż 50%. Ze względu na występowanie dużej ilości zmiennych w doświadczeniu i ich potencjalny złożony wpływ na proces oraz jakość produktu, zastosowano frakcyjny plan czynnikowy (ang. *Fractional Factorial Design*, FFD). W przebiegu jedenastu procesów

technologicznych zrealizowanych zgodnie z założeniami matrycy eksperymentu otrzymano mikrocząstki, które poddano analizie pod kątem wielkości cząstek, zawartości leku, skuteczności procesu enkapsulacji oraz poziomu wilgotności nośników (ryc. 1).



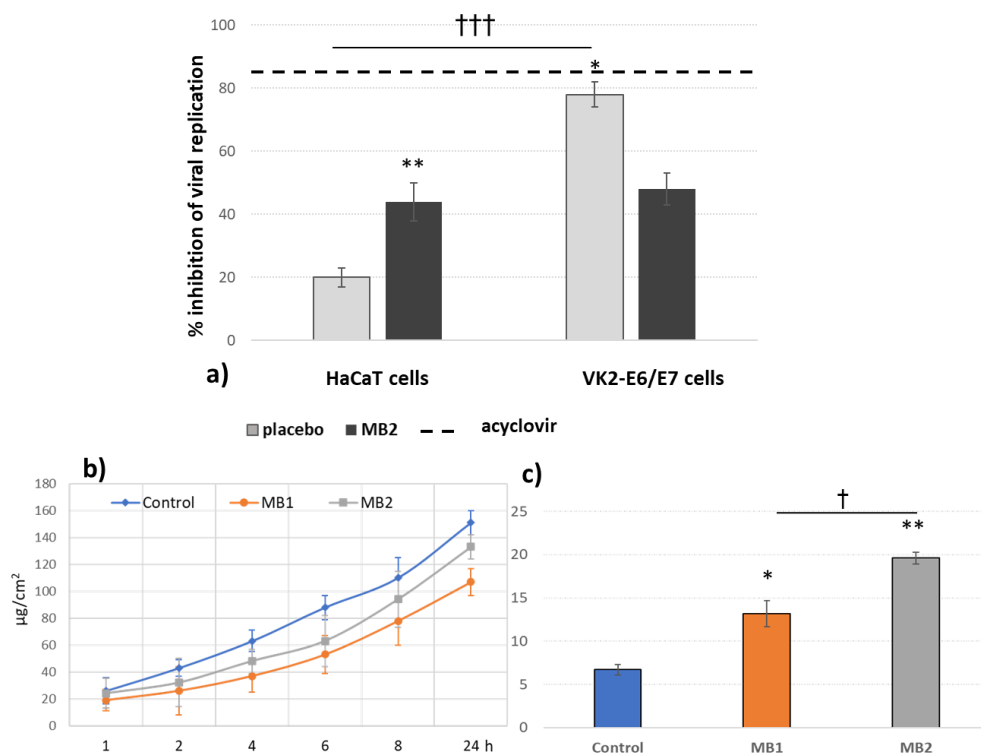
Rycina 1. Wyniki planu eksperymentalnego z wykorzystaniem frakcyjnego planu czynnikowego FFD z uwzględnieniem przewidywanych wartości zmiennych wejściowych (kolor czerwony) (Szymańska i wsp. 2019 [P1]).

Zaobserwowano, że zastosowanie chitozanu w postaci glutaminianu (zwłaszcza w połączeniu z dodatkowym współrozpuszczalnikiem) zapewniło lepszą wydajność procesu, a otrzymane nośniki leku charakteryzowały się wyższą zawartością substancji czynnej. Uzyskane wyniki były podstawą do wytypowania czterech formułacji różniących się temperaturą suszenia, stosunkiem polimeru do leku oraz obecnością dodatkowego współrozpuszczalnika, które poddano dalszej analizie. W badaniu metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej potwierdzono m.in. zachowanie krystalicznej struktury leku, a zaobserwowane przesunięcie pików topnienia substancji po zmieszaniu z glutaminianem chitozanu wskazuje na interakcje z nośnikiem polimerowym. W celu określenia profilu uwalniania, przeprowadzono następnie badania pęcznienia oraz dostępności farmaceutycznej substancji leczniczej z formułacji mikrocząstek. W doświadczeniach zaobserwowano wydłużony profil uwalniania, choć w przypadku nośnika o wyższym stosunku leku do polimeru (2:1, w/w) odnotowano dość istotny efekt pierwszego wyrzutu, tj. ok. 50% dawki leku pojawiło się w płynie akceptorowym w ciągu pierwszych 45 min badania. Wynikało to z obecności większej ilości kryształów substancji na powierzchni mikrocząstek. Wszystkie formułacje wykazały właściwości

pęcznienia i tworzenia hydrożelowej matrycy w kwaśnym środowisku buforu imitującego płyn pochwowy, choć kinetyka pęcznienia była wyraźnie wyższa dla mikrocząstek poddanych działaniu czynnika suszącego o wyższej temperaturze. W badaniach cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórek nabłonka pochwy VK2/E6E7 zaobserwowano wpływ czasu inkubacji i stężenia mikrocząstek z zydowudyną na przeżywalność i aktywność komórek. Do doświadczeń wytypowano dwie formułacje różniące się stosunkiem polimeru do leku, tj. 2:1 i 5:1 (w/w). Wstępna analiza przy użyciu kolorymetrycznego testu oceny aktywności metabolicznej komórek MTT wykazała zależną od stężenia cytotoksyczność nośników, choć zaobserwowany spadek przeżywalności komórek był umiarkowany (nie przekraczał 30% dla najwyższego stężenia po 24 h inkubacji) i najprawdopodobniej wynikał z niespecyficznych oddziaływań leku z białkami mitochondrialnymi prowadzących do zaburzeń metabolicznych komórek. W badaniu potencjału błonowego mitochondriów z użyciem barwnika fluorescencyjnego JC-1 odnotowano ok. 20% obniżenie potencjału po 24 h inkubacji z mikrocząstkami w najwyższym stężeniu. Nie zaobserwowano natomiast negatywnego wpływu polimerowego nośnika (bez leku) na przeżywalność i potencjał mitochondrialny linii VK2/E6E7. Warto podkreślić, że spadek przeżywalności komórek w obecności mikrocząstek z lekiem był niższy niż obserwowany w testach z użyciem czystej zydowudyny. Powyższe wyniki wskazują na ochronny wpływ polimerowego nośnika wobec komórek nabłonka.

W kolejnym etapie, dwie najbardziej obiecujące formułacje mikrocząstek różniące się stosunkiem polimeru do leku (tj. 2:1 i 5:1, w/w) zostały poddane dalszej, bardziej szczegółowej ocenie ich właściwości biologicznych [P2]. Badania objęły analizę właściwości mukoadhezyjnych opierającą się na pomiarze siły niezbędnej do przerwania oddziaływań pomiędzy postacią leku a materiałem biologicznym. Jako materiał biologiczny wykorzystano zaanonimizowany wypreparowany w trakcie zabiegu labioplastyki ludzki nabłonek pochwy (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr *R-I-002/462/2018*). Pomiary wykonywano dwoma metodami: tensometryczną z użyciem analizatora tekstury oraz grawimetryczną po uprzednim zdyspergowaniu mikrocząstek z buforem imitującym płyn pochwowy. Zaobserwowano istotny wpływ stosunku glutaminianu chitozanu do leku na zdolność oddziaływania nośników leku z nabłonkiem pochwy. Mikrocząstki o stosunku polimeru do substancji aktywnej 5:1 (w/w) charakteryzowały się wyższymi parametrami mukoadhezji, co wydaje się korzystne w aspekcie zapewnienia wydłużonego kontaktu leku z błoną śluzową. Istotnym elementem pracy było określenie aktywności przeciwwirusowej chitozanowych nośników z zydowudyną w warunkach *in vitro*. W badaniach wykorzystano szczep wirusa opryszczki narządów płciowych HSV-2, m.in. z uwagi na wysoką częstotliwość infekcji i pojawiającą się oporność wirusa na konwencjonalnie stosowaną farmakoterapię. Badania wykonano na dwóch modelach komórkowych – ludzkich keratynocytach HaCaT oraz komórek nabłonka pochwy VK2/E6E7. W celu określenia mechanizmu aktywności przeprowadzono testy wiązania oraz przenikania z użyciem szczepu referencyjnego HSV-2 333 wrażliwego na acyklowir. Ocenę ilościową opierającą się na detekcji materiału genetycznego wirusa HSV-2 wykonano techniką łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie

rzeczywistym RT-PCR. W doświadczeniach wykazano, że glutaminian chitozanu wykazuje *per se* właściwości hamujące wirusa HSV-2, a jego obecność potęguje aktywność przeciwwirusową modelowego mikrobicydu. Mechanizm działania związany jest z bezpośrednim oddziaływaniem z powierzchnią wirusa i blokowaniem jego wiązania do komórki, a także pośrednim poprzez tworzenie hydrożelowej bariery utrudniającej kontakt patogenu z komórkami błony śluzowej (ryc. 2a).



Rycina 2. (a) Hamowanie wiązania wirusa HSV-2 w warunkach *in vitro* na linii ludzkich keratynocytów HaCaT oraz komórek nabłonka pochwy VK2-E6/E7 w obecności mikrocząstek chitozanowych z zydowudyną (MB2, proporcja polimeru do leku 5:1) oraz mikrocząstek bez leku (placebo) w odniesieniu do kontroli (acyklowiru); (b) przenikanie oraz (c) retencja zydowudyny wyrażone w μg na jednostkę powierzchni ludzkiego nabłonka pochwy w zależności od zastosowanej formuacji mikrocząstek (MB1 i MB2 o stosunku polimeru do leku odpowiednio 2:1 oraz 5:1 (w/w)) lub kontroli - dyspersji zydowudyny w płynie imitującym wydzielinę pochwową (średnia \pm S.D.) (Szymańska i wsp. 2021 [P2])

W literaturze zwraca się uwagę na wpływ chitozanu na strukturę i konformację białek błon biologicznych oraz ładunek elektryczny na ich powierzchni, dzięki czemu może modyfikować transport substancji aktywnych do wnętrza komórek [18]. Dlatego też ważnym etapem było określenie zdolności przenikania substancji aktywnej zamkniętej w mikrocząstkach w warunkach *ex vivo* przez wypreparowany ludzki nabłonek pochwy. W doświadczeniach oceniano transport bierny zydowudyny w podaniu jednorazowym przez ludzką tkankę. Przenikanie bierne substancji zachodzi bez udziału energii, zgodnie z zasadami prawa Ficka. Oznacza to, że proces uzależniony jest jedynie od sił fizycznych: m.in.: dyfuzji, osmozy czy

energii kinetycznej powstałej na drodze drgań cząstek oraz ruchów Browna. Spośród metod oceny stopnia przenikania, w praktyce wykorzystuje się techniki *ex vivo* z użyciem wypreparowanego materiału biologicznego pochodzenia zwierzęcego lub ludzkiego oraz technik *in vitro*, t.j. przesiewowe testy PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), badania z wykorzystaniem trójwymiarowych komercyjnych modeli tkankowych czy biomimetycznych błon z tworzywa sztucznego.

Badania przenikania przeprowadzono przy użyciu aparatu przepływowego wyposażonego w teflonowe komory zgodne z komorami Brounagh zgodnie z obowiązującymi wytycznymi [31]. Dodatkowo wykonano badanie kontrolne z wykorzystaniem dyspersji zydowudyny w buforze imitującym płyn pochwy. Analizę ilości substancji aktywnej w płynie akceptorowym oraz kumulującej się w nabłonku pochwy wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Choć zydowudyna dobrze przenikała przez materiał biologiczny (o czym świadczyła obecność dość wysokich stężeń substancji w płynie akceptorowym w 1 godzinie analizy), zaobserwowano niższy stopień dyfuzji leku w doświadczeniach z użyciem mikrocząstek chitozanowych. Otrzymane różnice w stopniu przenikania modelowego mikrobicydu pomiędzy formulacjami oraz kontrolą wyraźnie wskazują, że ilość glutaminianu chitozanu ma wpływ na penetrację substancji aktywnej przez wypreparowany nabłonek pochwy (ryc. 2b). Retencja modelowego mikrobicydu w tkance w badaniach z użyciem mikrocząstek istotnie przekraczała wartości otrzymane dla kontroli z użyciem dyspersji zydowudyny (ryc. 2c). Warto podkreślić, że substancja lecznicza wykazywała tendencję do większej miejscowej kumulacji w tkance w badaniach z użyciem mikrocząstek o stężeniu polimeru do leku 5:1 (w/w), w których obserwowano jednocześnie wolniejszą w czasie penetrację zydowudyny. Pomimo słabszych właściwości mukoadhezyjnych w kontakcie z ludzkim nabłonkiem, wydaje się zatem, że powyższa formuacja lepiej wpisywałaby się w wymagania stawiane dla nośnika mikrobicydu. Niższe wartości przenikania substancji aktywnej przez nabłonek zmniejszają ryzyko wystąpienia ogólnoustrojowych działań niepożądanych przy jednocześnie dość wysokiej miejscowej retencji w komórkach nabłonka, która wydaje się sprzyjać osiągnięciu lepszego zabezpieczenia przed wnikaniem patogenów.

W podsumowaniu, optymalizacja technologii otrzymania mikrocząstek z glutaminianem chitozanu i zydowudyną przy wykorzystaniu metod DOE - poprzez odpowiedni dobór stężenia polimeru, substancji aktywnej i parametrów technologicznych umożliwiła otrzymanie mikrocząstek o pożądanych właściwościach biofarmaceutycznych oraz lepsze zrozumienie wpływu parametrów procesu suszenia rozpyłowego na charakterystykę polimerowych nośników. Przeprowadzone badania wykazały również wysoki potencjał glutaminianu chitozanu w technologii wielozbiornikowych postaci leku dla modelowego mikrobicydu. W oparciu o wyniki prac P1 i P2 wydaje się zatem, że zaprojektowane mikrocząstki z glutaminianu chitozanu spełniają założenia stawiane nośnikom dla mikrobicydu i wpisują się w aktualne trendy poszukiwania nowoczesnych rozwiązań profilaktycznych przeciwdziałających szerzeniu się infekcji wirusowych przenoszonych drogą płciową.

4.3.4. Optymalizacja profilu uwalniania substancji aktywnej z chitozanowych mikrocząstek po wprowadzenia czynnika sieciującego z zastosowaniem narzędzi planowania statystycznego

Powodzenie badań nad projektowaniem procesu suszenia rozpyłowego mikrocząstek z glutaminianem chitozanu zachęciło mnie do kontynuowania prac badawczych nad optymalizacją kinetyki uwalniania leku z nośników polimerowych z wykorzystaniem narzędzi planowania statystycznego. Wyniki zawarłam w artykule opublikowanym w 2020 roku (**P3**). W tym przypadku metody DOE miały pomóc w lepszym zrozumieniu wpływu składu form farmaceutycznych na dostępność farmaceutyczną oraz zawartość substancji aktywnej w ich strukturze. W założeniu dążono do wydłużenia profilu uwalniania substancji aktywnej oraz zmniejszenia efektu pierwszego wyrzutu (ang. *burst effect*) w początkowym etapie dyfuzji leku z nośnika (efekt ten obserwowano w pracy doświadczalnej P1). W celu zmodyfikowania kinetyki uwalniania zydowudyny z postaci leku zdecydowano o wprowadzeniu dodatkowego czynnika sieciującego - beta-glicerofosforan disodu do składu mikrocząstek. Beta-glicerofosforan disodu to nietoksyczny związek zdolny do tworzenia trwałych połączeń z grupami aminowymi chitozanu na drodze oddziaływań fizycznych w szerokim zakresie pH. Został on przeze mnie wykorzystany również w badaniach realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej nad oceną jakości hydrożeli oraz wielokompartментowych nośników dla substancji przeciwwgrzybiczej (zał.4, rozdział II, pkt. 1.1, prace 4,7,8). Do otrzymania mikrocząstek wykorzystano technikę suszenia rozpyłowego. Parametry metody zostały ustalone w oparciu o wyniki doświadczeń opublikowanych w pracy P1. Ze względu na złożoność procesu, zdecydowałam o wykorzystaniu matrycy piętnastu eksperymentów realizowanych zgodnie z planem Box-Behnkena. Model, zakładający trzy poziomy dla każdego parametru wejściowego, pozwolił na ograniczenie ilości eksperymentów i jednocześnie umożliwił wykrycie złożonych interakcji pomiędzy zmiennymi. W doświadczeniach oceniano wpływ składu i procesu sieciowania jonowego na zawartość leku w mikrocząstkach oraz dwa parametry dostępności farmaceutycznej, tj. efekt pierwszego wyrzutu, czyli procent dawki leku uwolnionej z mikrocząstek w ciągu pierwszych 30 min badania oraz czas, w którym w płynie akceptorowym zaobserwowano $\geq 80\%$ dawki leku (parametr $t_{80\%}$). Otrzymane formulacje poddano szczegółowej analizie fizykochemicznej z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej, dyfrakcji rentgenowskiej i spektroskopii Ramana. Doświadczenia wykonano w trakcie pobytu badawczego w Dziale Preformulacji Adamed Polska pod kierunkiem dr n. farm. Bartłomieja Kubiaka (zał. 6).

Wysokie wartości stopnia enkapsulacji leku (w zakresie od 80% do niemal 100%) potwierdziły poprawność zaplanowanego procesu i prawidłowo dobrane parametry suszenia rozpyłowego. Zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze zmniejszeniem stosunku glutaminianu chitozanu do leku (z 3:1 do 2:1, w/w), obserwowano poprawę enkapsulacji i zwiększenie zawartości leku w matrycy polimeru. Zastosowanie większej ilości beta-glicerofosforanu disodu i zmniejszenie stosunku polimeru do czynnika sieciującego (z 3:1 do 1:1, w/w) skutkowało natomiast otrzymaniem mikrocząstek o mniejszej zawartości substancji

lecniczej. W badaniu dostępności farmaceutycznej zydowudyny zaobserwowano istotne różnice pomiędzy formulacjami, choć należy podkreślić, że wszystkie preparaty odznaczały się dwustopniową kinetyką uwalniania substancji leczniczej: fazą pierwszego wyrzutu oraz fazą wydłużonego uwalniania. Obniżenie stosunku polimeru do leku (2:1, w/w) i większa zawartość zydowudyny w mikrocząstkach (>20%) przyczyniała się do nasilania efektu pierwszego wyrzutu. W analizie fizykochemicznej wykazano, że przyczyną tego zjawiska była adsorpcja kryształów leku na powierzchni mikrocząstek w efekcie ograniczonej pojemności matrycy polimeru. Ilość beta-glicerofosforanu disodu oraz proporcja polimeru do czynnika sieciującego w wielozbiornikowych nośnikach miała istotne znaczenie w aspekcie kinetyki pęcznienia oraz dawki leku uwolnionej z mikrocząstek w ciągu pierwszych 30 min badania. Umiarkowanymi wartościami efektu pierwszego wyrzutu odznaczały się formulacje o proporcji polimeru do czynnika sieciującego (1:1, w/w). Większa ilość czynnika sieciującego w matrycy mikrocząstek, poprzez zmniejszenie zdolności i kinetyki pęcznienia nośników w kontakcie z płynem pochwowym, ograniczała dyfuzję leku przez uwodnioną matrycę polimerową. W efekcie powodowało to wolniejsze w czasie uwalnianie leku i niższe wartości efektu pierwszego wyrzutu. Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu ilości beta-glicerofosforanu disodu na parametr $t_{80\%}$. Większa ilość czynnika sieciującego w mikrocząstkach nie wydłużała w sposób istotny dyfuzji zydowudyny z mikrocząstek chitozanowych. Powyższe obserwacje są zaskakujące w porównaniu do uprzednio przeprowadzonych badań, w których obserwowano wydłużenie profilu uwalniania leku z chitozanowej matrycy po uprzednim usieciowaniu fizycznym jego struktury [32].

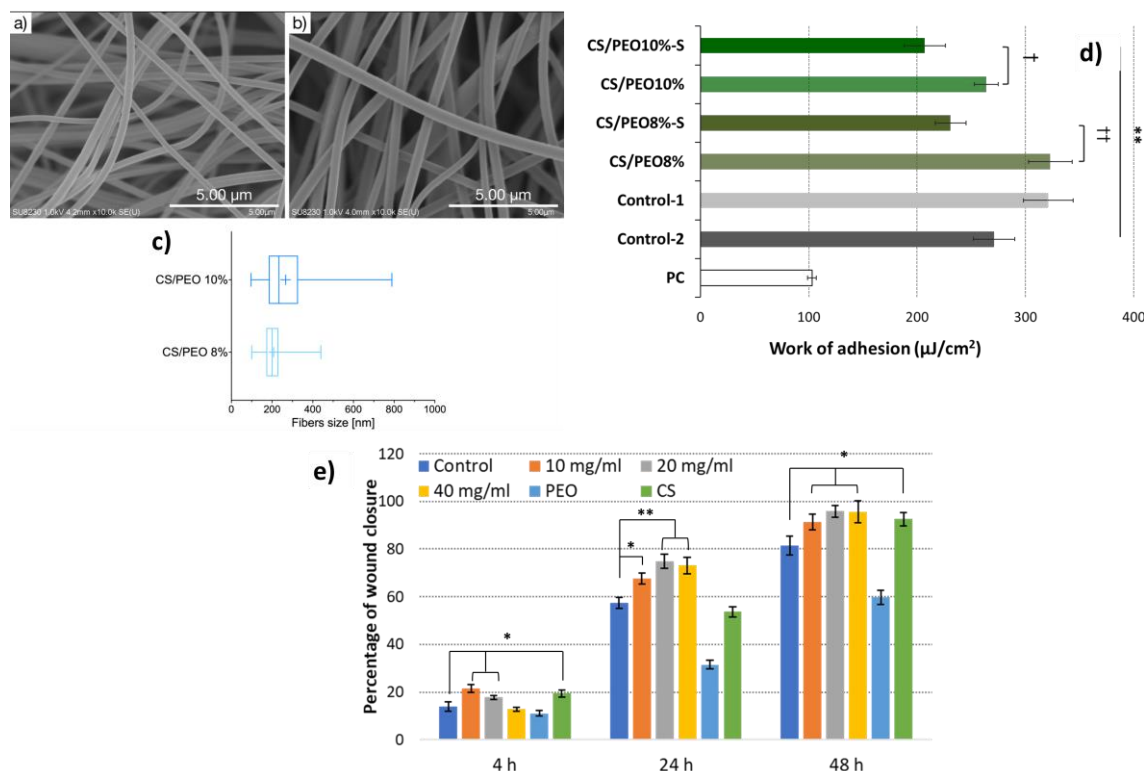
W oparciu o przeprowadzone doświadczenia wykazano złożony charakter uwalniania zydowudyny z wielokompartментowej postaci leku. Wpływ na proces miały zarówno stopień usieciowania polimeru oraz zawartość leku w matrycy chitozanu. W toku doświadczeń wytypowano optymalną formulację mikrocząstek charakteryzującą się wysoką zawartością zydowudyny, umiarkowanym efektem pierwszego wyrzutu oraz wydłużonym do czterech godzin uwalnianiem substancji leczniczej.

4.3.5 Ocena jakości i możliwości zastosowania nanowłókien chitozanowych otrzymanych metodą rozdmuchu roztworu polimeru w technologii farmaceutycznej

W ostatnich latach chitozany są intensywnie badane pod kątem zastosowania w technologii układów w rozproszeniu nano [33]. Wynika to m.in. z uwagi na ich hydrofilowy charakter, łatwość modyfikowania struktury i tworzenia różnorodnych form morfologicznych. Celowe wydało się zatem określenie roli chitozanu w technologii otrzymywania nanowłókien. W literaturze można odnaleźć wiele prac poświęconych materiałom chitozanowym uzyskanych w procesie elektroprzędzenia. W swojej pracy skupiałam się na stosunkowo nowej metodzie rozdmuchu roztworu polimeru, która w przeciwieństwie do elektroprzędzenia, nie wymaga zastosowania rozpuszczalników organicznych i napięcia elektrycznego [12]. Zasada metody rozdmuchu opiera się na przedzeniu wodnej dyspersji materiału polimerowego w wyniku

działania sprężonego gazu (najczęściej powietrza) o dużej prędkości. Kluczowy w procesie jest charakter reologiczny dyspersji polimerowej. Chitozan po rozpuszczeniu tworzy roztwory o zwiększonej lepkości. Podobnie jak w przypadku innych polimerów, stanowią one przykład płynów rozrzedzonym ścinaniem, co oznacza, że ich lepkość maleje ze wzrostem użytej siły (tzw. prędkości ścinania). Taki charakter reologiczny płynu wydaje się odpowiedni do otrzymywania materiałów włóknistych metodą przędzenia. Wstępna ocena reometryczna wykazała jednak zbyt krótki czas relaksacji analizowanych roztworów chitozanów (różniących się masą cząsteczkową, stężeniem oraz lepkością) uniemożliwiających ich zastosowanie w metodzie rozdmuchu. Zdecydowano zatem o wprowadzeniu dodatkowego polimeru: poli(tlenku etylenu) o korzystniejszych właściwościach reologicznych. Badania nad otrzymaniem nanowłókien prowadziłam we współpracy z Laboratorium Inżynierii Biomedycznej Politechniki Warszawskiej (zał. 6 oświadczenie potwierdzające pobyt badawczy, dokument umowy o współpracy Politechnika warszawska/UMB). W procesie rozdmuchu roztworu polimeru wykorzystano specjalistyczne urządzenie składające się z ruchomego kolektora (odbieralnika) oraz układu koncentrycznych dysz: wewnętrznej przez którą przepływa roztwór polimeru i zewnętrznej ze sprężonym gazem. W efekcie prac wstępnych doprecyzowano ciśnienie przepływu powietrza, szybkość przepływu roztworu mieszaniny polimeru, jego stężenie oraz proporcję polimerów w mieszaninie. Sporządzono dwie formułacje z chitozanu niemodyfikowanego o niskiej masie cząsteczkowej (232 kDa) i stopniu deacetylacji 80% oraz poli(tlenku etylenu) w proporcji 1:4, w/w. Formułacje różniły się stężeniem polimerów w mieszaninie poddanej procesowi rozdmuchu, t.j. 8% (w/w) (materiał CS/PEO 8%) i 10% (w/w) (materiał CS/PEO 10%). Otrzymane nanowłókna chitozanowe poddano szczegółowej analizie właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych pod kątem ich zastosowania jako materiały opatrunkowe (wyniki przedstawiono w pracy **P4**). Pomimo, iż na rynku dostępnych jest wiele rodzajów opatrunków, wciąż poszukiwane są nowoczesne rozwiązania umożliwiające szybsze i łatwiejsze gojenie ran. Wykorzystanie do tego celu chitozanu o korzystnych właściwościach hemostatycznych i absorpcyjnych wpisuje się zatem w aktualne trendy badawczo-rozwojowe [24].

Otrzymane materiały przyjęły postać białej, giętkiej włókniny o stosunkowo gładkiej powierzchni i średnicy włókien w zakresie 200-300 nm. W obrazie mikroskopowym zaobserwowano nieregularne, izotropowe rozmieszczenie włókien w strukturze materiału (ryc. 3a-b). Termin materiały izotropowe oznacza, że budujące je włókna układają się symetryczne względem wszystkich płaszczyzn, dzięki czemu wykazują podobne właściwości mechaniczne niezależnie od kierunku rozciągania.



Rycina 3. Obraz mikroskopowy nanowłókien przygotowanych z: (a) 8% lub (b) 10% (w/w) roztworu chitozanu (CS) i poli(tlenku etylenu) (PEO) (powiększenie $\times 10\,000$); (c) rozkład wielkości włókien; (d) ocena przylegania nanowłókien nie powlekanych oraz powlekanych warstwą poli(dimetylsiloksanu) do wypreparowanej ludzkiej skóry w odniesieniu do kontroli: materiału opatrunkowego Aquacel® (kontrola 1) i Sorbalgon® (kontrola 2) oraz filmu celulozowego (PC); (e) Migracja fibroblastów skóry w warunkach *in vitro* wyrażona jako procent powierzchni zamknięcia rany po inkubacji z ekstraktem nanowłókien CS/PEO 10% w zakresie stężeń 10-40 mg/ml w odniesieniu do: roztworu PEO, CS oraz komórek nie poddanych działaniu żadnych związków (kontrola) (Szymańska i wsp. 2022, P4).

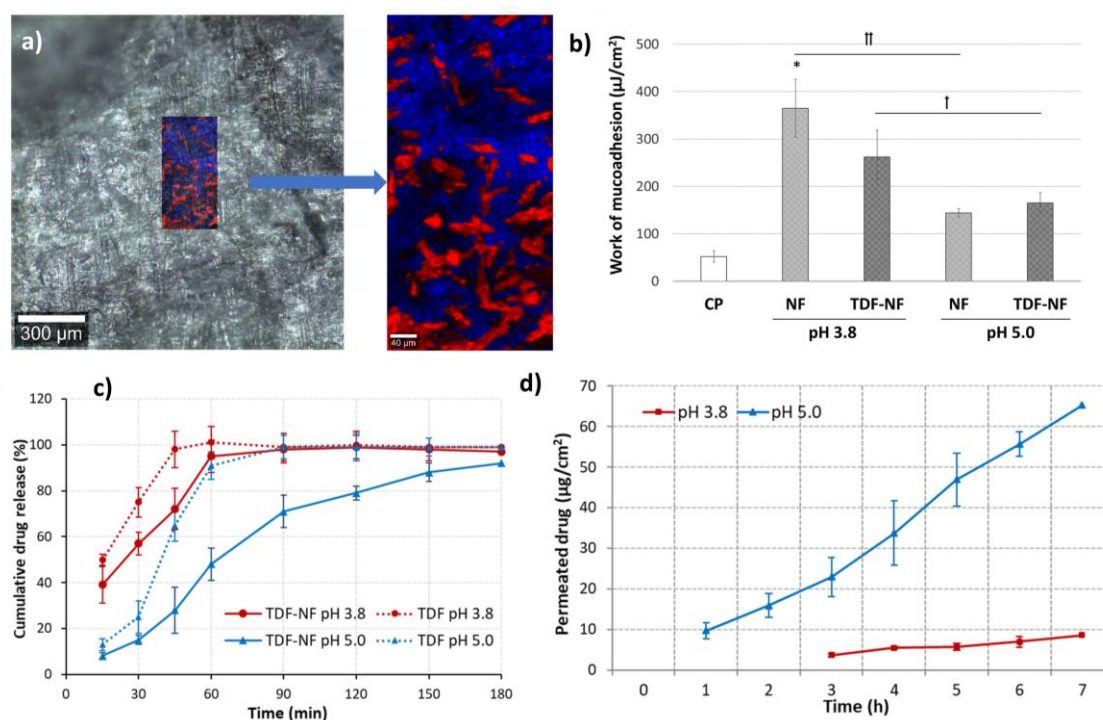
Obie formułacje charakteryzowały się wysoką porowatością w porównaniu do komercyjnych materiałów opatrunkowych z karboksymetylocelulozy sodowej (Aquacel®) i alginianu wapnia (Sorbalgon®). Niższe stężenie polimerów w roztworze przyczyniło się do zmniejszenia średnicy włókien oraz porowatości materiału CS/PEO 8% - parametru decydującego o chłonności i dobrej przepuszczalności powietrza. W pracy oceniano również potencjał nanowłókien CS/PEO do stymulowania procesu gojenia się ran w warunkach *in vitro*. Pomimo, iż badania wskazują, że chitozan pobudza proces migracji neutrofili i makrofagów oraz nasila aktywność fibroblastów [33], istotne było zbadanie czy modyfikacja fizyczna polimeru na skutek procesu technologicznego wpływa na jego właściwości regenerujące. Badania przeprowadzone za pomocą testu „scratch” na linii ludzkich fibroblastów HDFa wykazały, że nanowłókna posiadają zdolność do pobudzania aktywności komórek skóry już na wczesnym etapie zranienia, a proces rozdmuchu roztworu polimeru nie zmienił właściwości biologicznych chitozanu (ryc. 3e). Dodatkowo w ocenie cytotoksyczności z

wykorzystaniem trójwymiarowego modelu naskórka EpiSkin® odnotowano brak potencjału drażniącego nanowłókien podczas 24 godzinnej inkubacji z tkanką.

Ważny element pracy stanowiła analiza wpływu powlekania warstwą poli(dimetylsiloksanu) na właściwości mechaniczne, absorpcyjne i bioadhezyjne materiałów polimerowych. Obecność hydrofobowej powłoki zapewniała lepsze zabezpieczenie przed dostępem wilgoci choć w badaniach tensometrycznych wykazano, że osłabia parametry wytrzymałościowe nanowłókien polimerowych. Niemniej należy podkreślić, że wyniki sprężystości oraz wytrzymałości na rozciąganie uzyskane dla nanowłókien powlekanych były wyższe niż te otrzymane dla komercyjnych materiałów opatrunkowych o strukturze włóknin. W ocenie właściwości absorpcyjnych *in vitro* wykazano, że zarówno materiały niepowlekane i powlekane charakteryzują się wysoką zdolnością do pochłaniania płynu imitującego wydzielinę z ran. W początkowej fazie testu, płyn był niemal natychmiast absorbowany przez nanowłókna, które stopniowo przekształcały się w hydrożelową matrycę. W późniejszym etapie zaobserwowano jednak, że badane materiały (w szczególności nanowłókna z warstwą poli(dimetylsiloksanu)) wolniej pochłaniały płyn w porównaniu do dostępnych materiałów opatrunkowych. Wskazuje to na umiarkowane zdolności absorpcyjne nanowłókien i potencjał zastosowania w leczeniu ran średnim stopniu wysięku t.j. owrzodzenia czy oparzenia I czy II stopnia. W badaniu tensometrycznym zdolności oddziaływania z wypreparowaną ludzką skórą (zgoda Komisji Bioetycznej UMB nr R-I-002/305/2019) zaobserwowano, że materiały odznaczały się zróżnicowanym stopniem bioadhezyjności do skóry. W przypadku wyrobów opatrunkowych cecha ta zapewnia utrzymanie materiału w miejscu aplikacji i ochronę zranionego obszaru niezależnie od aktywności pacjenta. Z drugiej strony, zbyt mocne przywieranie opatrunku do rany jest niepożądane, może bowiem powodować ból oraz uszkodzenia okolicznych tkanek na etapie jego wymiany. Niższe wartości parametrów bioadhezji uzyskane dla formułacji CS/PEO 10 %, w szczególności po dodatkowym powlekanu warstwą poli(dimetylsiloksanu) w porównaniu do wyników uzyskanych dla formułacji CS/PEO 8% oraz komercyjnych materiałów opatrunkowych sugerują, że materiał ten może być łatwiej usuwany z powierzchni skóry, a tym samym potencjalnie mniej drażniący w kontakcie z raną. W toku przeprowadzonych badań wytypowano formułację CS/PEO 10% powlekaną warstwą poli(dimetylsiloksanu) jako materiał opatrunkowy o korzystniejszych parametrach wytrzymałościowych, wysokiej porowatości i umiarkowanej bioadhezji.

Równolegle do doświadczeń oceniających nanowłókna jako materiały opatrunkowe prowadzono prace nad inkorporowaniem dizoproksylu tenofowiru do polimerowego nanonośnika oraz oceną jakości kompozycji farmaceutycznej dla leku przeciwwirusowego do podania dopochwowego. Wyniki doświadczeń przedstawiono w pracy **P5**. Dizoproksyl tenofowiru to prolek należący do grupy inhibitorów odwrotnej transkryptazy, który w organizmie przekształca się w aktywną formę tenofowiru. W porównaniu do tenofowiru, forma proleku charakteryzuje się wyższą biodostępnością i silniejszą aktywnością farmakologiczną.

Postać filmu zbudowanego z nanowłókien wydaje się szczególnie atrakcyjna w aspekcie podania dopochwowego i profilaktyki zakażeń przenoszonych drogą płciową ze względów aplikacyjnych. Dyskretna postać cienkiego filmu zmniejsza dyskomfort i ryzyko podrażnień na etapie aplikacji. Dodatkowo, dzięki rozbudowanej powierzchni polimerowego materiału możliwe jest osiągnięcie wydłużonego czasu kontaktu leku z błoną śluzową i w efekcie uzyskanie pożądanego efektu farmakologicznego. Podczas badań preformulacyjnych z mieszaniny polimerów i leku o stężeniu 12% (w/w) uzyskano materiał o jednorodnym rozmieszczeniu cząstek leku w matrycy polimerowej, co potwierdzono mapowaniem powierzchni nanowłókien techniką ramanowską (ryc. 4a).



Rycina 4. (a) Przykładowa mikrofotografia powierzchni nanowłókien wraz z mapą dystrybucji dizoproksylu tenofowiru (czerwony), nanowłókien CS/PEO (niebieski); powiększenie $\times 10$; (b) Praca mukoadhezji wyznaczona dla nanowłókien z lekiem oraz placebo; CP- film celulozowy (kontrola); (c) Procent dawki leku uwalnionej z matrycy nanowłókien w zależności od pH płynu pochwowego w porównaniu do badań z użyciem czystej substancji aktywnej; (d) Przenikanie na drodze transportu biernego dizoproksylu tenofowiru przez wypreparowany ludzki nabłonek pochwy w zależności od pH dyspersji płynu pochwowego z lekiem ($n=4$, średnia \pm S.D.) (Szymańska i wsp. 2022, [P5]).

Wydajność zamknięcia substancji aktywnej w nośniku wyniosła blisko 70%. Proces rozdmuchu roztworu zasadniczo nie zmienił właściwości fizykochemicznych polimeru ani aktywności przeciwwirusowej substancji aktywnej. W warunkach *in vitro* wykazano hamowanie wirusa HSV-2 w obecności nanowłókien choć efekt ten zdawał się być nie związany ze stężeniem użytego materiału. Brak korelacji dawka-efekt najprawdopodobniej wynikał z zahamowania wychwytu proleku przez komórki i czasowego wysycenia enzymów odpowiedzialnych za jego hydrolizę do tenofowiru [34]. Nie zaobserwowano natomiast

aktywności przeciwwirusowej per se nanowłókien bez leku (placebo), co najprawdopodobniej wiązało się z obecnością dodatkowego polimeru poli(tlenku etylenu) w matrycy nośnika. Nie można jednak wykluczyć wpływu procesu SBS na zmianę właściwości samego chitozanu. W ocenie cytotoksyczności wykazano biogodność materiału w kontakcie z komórkami nabłonka pochwy VK2/E6E7.

Niezwykle istotnym elementem doświadczeń było wykazanie zależności pomiędzy właściwościami mukoadhezyjnymi i kinetyką uwalniania substancji aktywnej z matrycy nanowłókien a pH płynu pochwowego. W warunkach fizjologicznych odczyn wydzieliny pochwowej jest kwaśny i waha się w granicach od 3,8 do 4,5, choć u kobiet w okresie menopauzalnym wartości te wzrastają do ok 5,0 [35]. W badaniach z użyciem płynu imitującego wydzielinę pochwową o pH 3,8 obserwowano istotne nasilenie zdolności oddziaływania nanowłókien z ludzkim nabłonkiem pochwy oraz stosunkowo silne pęcznienie formulacji, co w efekcie powodowało szybszą dyfuzję leku z nośnika (ryc. 4b-c). Proces ten związany był z większą ilością zjonizowanych grup aminowych w cząsteczce chitozanu w silnie kwaśnym pH. W efekcie odpychania łańcuchów polimeru przez jednoimiennie ładunki, dochodziło do rozluźniania struktury przestrzennej nośnika i lepszej penetracji płynu do jego wnętrza. Odmienne zachowanie nanowłókien chitozanowych obserwowano w pH 5,0. Wzrost pH płynu pochwowego przyczynił się do wydłużenia kinetyki uwalniania dizoproksylu tenofowiru (przy jednoczesnym zmniejszeniu efektu pierwszego wyrzutu) ze zwartej hydrożelowej matrycy ale również osłabienia właściwości mukoadhezyjnych. Warto podkreślić, że fizjologiczne zmiany pH wydzieliny pochwowej w zakresie 3,8-5,0 modulowały nie tylko właściwości nanowłókien, ale również wpłynęły na stopień przenikania dizoproksylu tenofowiru przez ludzki nabłonek pochwy. Okazało się, nawet niewielki wzrost pH z 3,5 do 5,0 zwiększał szybkość przenikania oraz akumulację modelowego mikrobicydu w tkance (ryc. 4d). Obserwowane zmiany wynikały m.in. z odmiennego stopnia zjonizowania cząsteczki leku w badanym zakresie pH. Powyższe obserwacje potwierdzają, że zmienności międzyosobnicze w zakresie wspomnianego odczynu płynu pochwowego mają istotny wpływ na biodostępność leku po podaniu dopochwowym [36].

W oparciu o przeprowadzone doświadczenia należy stwierdzić, że zaprojektowane nanowłókna z tenofowirem dizoproksylu wydają się atrakcyjną formą leku do podania dopochwowego wykazującą cechy inteligentnego nośnika zależnego od pH. Silniejsze przyleganie do tkanki i szybsze uwalnianie leku z polimerowej matrycy w kwaśnym pH płynu pochwowego wydaje się sprzyjać zainicjowaniu absorpcji leku przez błony biologiczne. Wydłużone w czasie, bardziej kontrolowane uwalnianie leku z matrycy w pH 5,0 może natomiast kompensować silniejsze i szybsze przenikanie leku oraz zmniejszenie rozrzutów stężeń substancji aktywnej w tkance. Powyższe obserwacje wskazują ponadto na wielofunkcyjny charakter nanowłókien chitozanowych oraz możliwość ich wykorzystania zarówno jako platformy dla leków do podania miejscowego, jak również jako materiał opatrunkowy do stosowania na rany o umiarkowanym stopniu wysięku.

4.4. PODSUMOWANIE

Prezentowany cykl prac nad rozwojem nowoczesnych form farmaceutycznych opartych o unikalne połączenie substancji aktywnej i chitozanu, stanowi kompleksowe opracowanie technologii otrzymywania nanowłókien i wielozbiornikowych nośników leku oraz ich charakterystyki w aspekcie zastosowania miejscowego jako postaci leku dla mikrobicydu oraz materiały opatrunkowe.

Przeprowadzone badania wykazały wysoki potencjał glutaminianu chitozanu w technologii suszenia rozpyłowego mikrocząstek oraz chitozanu niemodyfikowanego o niskiej masie cząsteczkowej w otrzymywaniu nanowłókien metodą rozdmuchu roztworu polimeru. Modyfikacja fizyczna na etapie tworzenia formułacji zasadniczo nie zmieniała właściwości biologicznych chitozanów. Testowane nośniki odznaczały się biogodnością, zdolnością do oddziaływania ze skórą i błoną śluzową, a w przypadku nanowłókien – także właściwościami regenerującymi. Na uwagę zasługuje również odkrycie, że glutaminian chitozanu poprzez hamowanie wiązania wirusa HSV-2 do komórki potęguje aktywność farmakologiczną mikrobicydu. Działania przeciwwirusowego chitozanu nie potwierdzono natomiast w doświadczeniach z użyciem nanowłókien co może wskazywać na wpływ procesu rozdmuchu roztworu polimeru lub obecności dodatkowego polimeru na aktywność biologiczną chitozanu. Przeprowadzone doświadczenia podkreśliły również znaczenie statystycznych narzędzi planowania doświadczeń w projektowaniu procesów technologicznych.

Uzyskane wyniki zestawione w jednotematyczny cykl publikacji umożliwiające podsumowanie mojego dorobku naukowego, w którym można wskazać dwie grupy osiągnięć:

1. W zakresie badań podstawowych:

- (a) Ocena wpływu modyfikacji fizycznej chitozanów na aktywność przeciwwirusową i synergizm działania wobec wirusa HSV-2
- (b) Zbadanie roli polimeru w modulowaniu transportu biernego substancji aktywnej przez ludzki nabłonek pochwy
- (c) Ocena wpływu parametrów technologicznych i substancji pomocniczych na właściwości fizykochemiczne oraz profil bezpieczeństwa chitozanowych nośników w warunkach in vitro
- (d) Zbadanie potencjału drażniącego nanowłókien chitozanowych w kontakcie z trójwymiarowym ludzkim modelem skóry oraz określenie roli chitozanu w procesie gojenia ran

2. W zakresie badań aplikacyjnych:

- (a) Optymalizacja technologii suszenia rozpyłowego mikrocząstek z modelowym mikrobicydem

(b) Wytypowanie czynników o kluczowym wpływie na jakość otrzymanych nanowłókien chitozanowych w kontekście ich wykorzystania jako materiał opatrunkowy oraz nośnik mikrobicydu do podania dopochwowego

W podsumowaniu, opracowanie procedury wytwarzania chitozanowych form farmaceutycznych połączone z ich pełną charakterystyką fizykochemiczną i biofarmaceutyczną umożliwiły poznanie i pełniejsze zrozumienie znaczenia oraz możliwości wykorzystania modyfikowanych fizycznie chitozanów w technologii farmaceutycznej.

4.5. LITERATURA

1. Bale S., Khurana A., Reddy A.S., Singh M., Godugu C. Overview on therapeutic applications of microparticulate drug delivery systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* **2016**, 33: 309.
2. Dos Santos A.M., Carvalho S.G., Meneguín A.B., Sábio R.M., Gremião M.P.D., Chorilli M.J. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. *Control Release.* **2021**, 334: 353.
3. Bartos C., Varga P., Szabó-Révész P., Ambrus R. Physicochemical and in vitro characterization of chitosan-based microspheres intended for nasal administration. *Pharmaceutics.* **2021**, 13: 608.
4. Mahmood A., Laffleur F., Leonaviciute G., Bernkop-Schnürch A. Protease-functionalized mucus penetrating microparticles: In-vivo evidence for their potential. *Int J Pharm.* **2017**, 532: 177.
5. Esteban-Pérez S., Bravo-Osuna I., Andrés-Guerrero V., Molina-Martínez I.T., Herrero-Vanrell R. Trojan microparticles potential for ophthalmic drug delivery. *Curr Med Chem.* **2020**, 27: 570.
6. Baza danych o lekach PHARMINDEX w Internet: www.pharmindex.pl
7. Baza danych o lekach Drugs.com w Internet: <https://www.drugs.com>
8. Chang H.I., Yeh M.K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine.* **2012**, 7: 49.
9. Abu-Zaid A., Alshahrani M.S., Bakhsh H. i wsp. Astodimer gel for treatment of bacterial vaginosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Clin Pract.* **2021**, 75: e14165.
10. Charakterystyka produktu AVflo™ Nicast. Nicast's AVflo(TM) For Hemodialysis Patients Receives CE Mark. Z Internet: www.biospace.com/article/releases/nicast-s-avflo-tm-for-hemodialysis-patients.html
11. Agarwal S., Wendorff J.H., Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer.* **2009**, 49, 5603.
12. Dadol G.C., Kilic A., Tijing L.D., Lim K.J.A., Cabatingan L.K., Tan N.P.B., Stojanovska E., Polat Y. Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: materials, methods, and applications. *Mater. Today Commun.* **2020**, 25, 101656.
13. Jin G., He R., Sha B., Li W., Qing H., Teng R., Xu F. Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, 92: 995.
14. Miguel S.P., Figueira D.R., Simões D., Ribeiro M.P., Coutinho P., Ferreira P., Correia I.J. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2018**, 169: 60.
15. Sabra S., Ragab D.M., Agwa M.M., Rohani S. Recent advances in electrospun nanofibers for some biomedical applications. *Eur J Pharm Sci.* **2020**, 144: 105224.
16. Sousa M.G.C., Rezende T.M.B., Franco O.L. Nanofibers as drug-delivery systems for antimicrobial peptides. *Drug Discov Today.* **2021**, 26: 2064.

17. Cheung R.C., Ng T.B., Wong J.H., Chan W.Y. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*. **2015**, 13: 5156.
18. He W., Guo X., Xiao L., Feng M. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. *Int J Pharm*. **2009**, 382: 234.
19. Abruzzo A., Giordani B., Miti A., Vitali B., Zuccheri G., Cerchiara T., Luppi B., Bigucci F. Mucoadhesive and mucopenetrating chitosan nanoparticles for glycopeptide antibiotic administration. *Int J Pharm*. **2021**, 606: 120874.
20. Sahariah, P.; Másson, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship. *Biomacromolecules*. **2017**, 18: 3846.
21. Jaber N., Al-Remawi M., Al-Akayleh F., Al-Muhtaseb, N., Al-Adham I. S., Collier P. J. A review of the antiviral activity of chitosan, including patented applications and its potential use against COVID-19. *J Appl Microbiol*. **2022**, 132: 41.
22. Safarzadeh M., Sadeghi S., Azizi M., Rastegari-Pouyani M., Pouriran R., Hoseini M.H.M. Chitin and chitosan as tools to combat COVID-19: A triple approach. *Int J Biol Macromol*. **2021**, 183: 235.
23. Charakterystyka produktu Novochizol™ z Internet: <https://www.swissbiotech.org/listing/novochizol-sa>
24. Park J., Song E., Jeong S., Song J., Kim H., Kim S. Chitosan-based dressing materials for problematic wound management. *Adv. Exp. Med. Biol*. **2018**, 6, 527.
25. Azuma K., Osaki T., Minami S., Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J Funct Biomater*. **2015**, 6, 33.
26. Huang J., Ren J., Chen G., Li Z., Liu Y., Wang G., Wu X. Tunable sequential drug delivery system based on chitosan/hyaluronic acid hydrogels and PLGA microspheres for management of non-healing infected wounds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. **2018**, 89: 213.
27. Światowa Organizacja Zdrowia. World Health Organization. Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016–2021 w Internet: www.who.int/reproductivehealth
28. Unemo M., Bradshaw C.S., Hocking J.S. i wsp. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis*. **2017**, 17: e235.
29. Mesquita L., Galante J., Nunes R., Sarmiento B., das Neves J. Pharmaceutical vehicles for vaginal and rectal administration of anti-HIV microbicide nanosystems. *Pharmaceutics*. **2019**, 11: 145.
30. Szekalska M., Sosnowska K., Zakrzewska A., Kasacka I., Lewandowska A., Winnicka K. The influence of chitosan cross-linking on the properties of alginate microparticles with metformin hydrochloride— in vitro and in vivo evaluation. *Molecules*. **2017**, 22: 182.
31. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, In Vitro Skin and Mucosa Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD/OCDE 439, 2015; EN ISO 10993-10:2013 Biological evaluation of medical devices- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (ISO 10993-10:2010) w Internet: <https://www.oecd.org>
32. Supper S., Anton N., Seidel N., Riemenschnitter M., Curdy C., Vandamme T. Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. **2014**, 11: 249.
33. Ding F., Deng H., Du Y., Shi X., Wang Q. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale*. **2014**, 6: 9477.
34. Taneva E., Crooker K., Park S.H. i wsp. Differential mechanisms of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate cellular transport and implications for topical preexposure prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. **2016**, 60: 1667.

35. Panda, S.; Das, A.; Singh, A.S.; Pala, S. Vaginal pH: A Marker for Menopause. *J Mid-Life Health*. **2014**, 5: 34-37.
36. Das Neves J., Notario-Pérez F., Sarmento B. Women-specific routes of administration for drugs: A critical overview. *Adv Drug Deliv Rev*. **2021**, 176: 113865.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Współpraca z ośrodkami naukowymi rozpoczęła się w 2015 podczas mojego pobytu w Wageningen University, Holandia (realizowanego w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego TransFormation.doc) oraz studiów podyplomowych na Uniwersytecie Jagiellońskim kiedy to miałam możliwość nawiązać kontakty z przedstawicielami ośrodków naukowych i badawczo-rozwojowych. Jednym z pierwszych wieloośrodkowych projektów, w których uczestniczyłam dotyczył badań w zakresie działania immunomodulującego oraz wyjaśnienia mechanizmu aktywności mukoadhezyjnych hydrożeli zawierających nanocząstki srebra sfunkcjonalizowane kwasem taninowym jako strategii leczenia i zapobiegania zakażeń wirusem opryszczki typu 2. Efektem współpracy z dr hab. Małgorzatą Krzyżowską z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie była publikacja w *International Journal of Molecular Sciences* (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2, praca nr 12) oraz prace (zał. 4, pkt. I prace nr 2,4) w których oceniano aktywność przeciwwirusową nanomateriałów (badania realizowano w Uniwersytecie w Göteborgu, Szwecja). Od tamtego czasu badania wieloośrodkowe stanowią ważny element mojej aktywności zawodowej:

- efektem współpracy z ośrodkami międzynarodowymi: **Katedrą Farmacji Stosowanej Uniwersytetu w Ljubljanie** (Słowenia) pod kierunkiem prof. Srčiča, **Katedrą Inżynierii Chemicznej Wyższej Szkoły Chemiczno-Technologicznej w Pradze** (Czechy) oraz **Katedrą Farmacji Stosowanej Uniwersytetu w Zagrzebiu** (Chorwacja) kierowanym przez prof. Anitę Hafner w zakresie badań fizykochemicznych nośników leku zawierających modyfikowany fizycznie chitozan były publikacje w czasopismach *Marine Drugs* (2016), *Pharmaceutics* (2021) oraz *Materials* (2021) (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2., prace nr 8,19,22)

- wieloletnia współpraca z dr. Anną Basą i dr hab. Agnieszką Zofią Wilczewską z **Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku** w zakresie analiz fizykochemicznych nośników leku do podania miejscowego zaowocowała 5 publikacjami w *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *Materials*, *Pharmaceutics*, *International Journal of Pharmaceutics*, *Polymers* (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2., prace nr 3,7,21-23)

- badania naukowe prowadzone w udokumentowanej współpracy z dr inż. Michałem Wojasińskim i prof. dr hab. inż. Tomaszem Ciachem z **Laboratorium Inżynierii Biomedycznej Politechniki Warszawskiej** (umowa o współpracy z 2021, zał. 6) w zakresie zastosowania techniki rozdmuchu roztworu polimeru do otrzymywania nanowłókien o potencjale wykorzystania jako nośnik leku oraz materiał opatrunkowy zaowocowały publikacjami w

International Journal of Molecular Sciences oraz *International Journal of Biological Macromolecules* (zał. 4, pkt. I prace nr 4,5); w ramach współpracy z ośrodkiem w 2021 roku odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (zał. 6)

- efektem udokumentowanej współpracy z **Katedrą i Zakładem Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu** (umowa o współpracy, zał. 6) dotyczącej oceny cech mukoadhezyjnych nośników leku z surowcami pochodzenia roślinnego (zadania realizowanego w ramach projektu NCN Sonata (2020/39/D/NZ7/01824) kierowanego przez dr. Magdalenę Paczkowską-Walendowską) są 4 prace opublikowane w *Journal of Clinical Medicine, Pharmaceutics* oraz *International Journal of Molecular Sciences* (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2., prace nr 16-19)

- współpraca z zespołem prof. dr hab. Michała Markuszewskiego z **Zakładu Biofarmacji i Farmakokinetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** w zakresie doskonalenia statystycznych metod projektowania procesu technologicznego zaowocowała cyklem prac opublikowanych w *International Journal of Pharmaceutics, Pharmaceutics* oraz *Materials* (zał. 4, rozdział I prace nr 1,3); w ramach współpracy z ośrodkiem w 2019 roku odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (zał. 6)

- współpraca z prof. Krzysztofem Calem z **Katedry Technologii Postaci Leku Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** umożliwiła rozszerzenie moich badań o model eksperymentalny oceny przenikania substancji aktywnych w warunkach ex vivo przez ludzki materiał biologiczny; przy użyciu powyższego modelu prowadziłam badania, m.in. nad transportem mikrobicydu przez ludzki nabłonek pochwy (zał. 4, rozdział I praca nr 4) oraz zdolności przenikania i retencji substancji przeciwdrobnoustrojowych przez błonę śluzową jamy ustnej, jak również prac na zlecenie podmiotów zewnętrznych (zał. 4, rozdział III, pkt. 1)

- efektem wieloletniej współpracy z pracownikami **Działu Preformulacji w Obszarze Badawczo-Rozwojowym Adamed Pharma** w zakresie zastosowania nowoczesnych technik analizy fizykochemicznej w ocenie polimerowych nośników leku są prace opublikowane w *Pharmaceutics* oraz *International Journal of Biological Macromolecules* (zał. 4, pkt. I prace nr 3,5); w ramach współpracy z ośrodkiem w 2020 roku odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (zał. 6)

- współpraca z dr. Renatą Dębowską, kierownika **Działu Badawczo-Rozwojowego Laboratorium Dr Irena Eris** w zakresie doskonalenia metod oceny drażniącego potencjału preparatów miejscowych in vitro w kontakcie z modelem tkankowym 3D zaowocowała pracą w *International Journal of Molecular Sciences* (zał. 4, pkt. I prace nr 4); w ramach współpracy z ośrodkiem w 2022 roku odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (zał. 6).

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ I SZTUKĘ

6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

6.1.1. Kształcenie przeddyplomowe

od 2008 roku prowadzenie zajęć dla studentów III i IV roku Farmacji z przedmiotu Technologia Postaci Leku

od 2009 opracowanie i prowadzenie zajęć dla studentów V roku Farmacji z przedmiotu Technologia Postaci Leku III (*Sporządzanie leków recepturowych z antybiotykami, Solubilizacja, Technologia środków kosmetycznych*) oraz Farmacja praktyczna w aptece z opieką farmaceutyczną

od 2014 opracowanie i prowadzenie zajęć fakultatywnych dla studentów III roku Farmacji z przedmiotu *Technologia preparatów kosmetycznych*

Od 2011 roku opracowanie i prowadzenie wykładów dla studentów III, IV i V roku kierunku Farmacja dotyczących: *Zasady dobrej praktyki wytwarzania leków, Technologia analizy procesu jako system optymalizacji przemysłowej produkcji leków, Preparaty radiofarmaceutyczne, Preparaty homeopatycznych*

6.1.2. Kształcenie podyplomowe

Od 2011 roku opracowanie oraz prowadzenie wykładów oraz ćwiczeń w ramach szkolenia specjalizacyjnego dla farmaceutów, organizowanych przez Studium Kształcenia Podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym UMB poświęconych:

- *Opiece farmaceutycznej nad pacjentem onkologicznym*
- *Opiece farmaceutycznej w astmie i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc*
- *Jakości produktu leczniczego w aspekcie dopuszczenia do obrotu*
- *Terapii homeopatycznej*
- *Aseptyczne sporządzanie leków ocznych*

6.1.3. Opieka naukowa nad studentami

➤ Od 2017 roku opiekun Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Farmacji Stosowanej

Efektem pracy Koła Naukowego są trzy punktowane prace naukowe o zasięgu krajowym i międzynarodowym (zał. 4, rozdział I prace 3, 4; rozdział II, pkt. 2). Studenci uczestniczyli w badaniach naukowych, których wyniki zostały zaprezentowane w podczas *XIII Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego* w Krakowie w 2017 roku oraz na *14th*

BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists w 2019 roku. Koło naukowe wykazało się również aktywnością popularyzującą nauki farmaceutyczne podczas organizacji warsztatów dla uczniów szkół podstawowych oraz przedszkoli woj. podlaskiego: *Farmaceuta - kto to taki?* (2018, 2019); w latach 2018 oraz 2019 zostało docenione III miejscem w rankingu studenckich kół naukowych UMB

- W latach 2010-2015 opiekun 3 prac magisterskich
- Od 2016 promotor 6 prac magisterskich:

„Niezgodności recepturowe przy sporządzaniu półstałych postaci leku zawierających mocznik”, Joanna Potaś, Farmacja (2018)

„Technologia sporządzania i ocena właściwości preparatów kosmetycznych z witaminą C”, Milena Bastek, Kosmetologia (2018)

„Optymalizacja technologii otrzymywania wielokompartментowych nośników zydowudyny do podania miejscowego”, Karolina Fiedorczyk, Farmacja (2019)

„Wpływ sieciowania jonowego na dostępność farmaceutyczną zidowudyny z mikrocząstek chitozanowych”, Magdalena Dąbrowska, Farmacja (2020)

„Ocena zdolności przenikania substancji przeciwwirusowej przez ludzki nabłonek pochwy z wybranych nośników o właściwościach mukoadhezyjnych”, Kamil Adasiewicz, Farmacja (2021)

„Ocena właściwości farmaceutycznych nanowłókien chitozanowych jako materiałów opatrunkowych na rany”, Natalia Czajka, Farmacja (2022)

6.1.4. Recenzje prac magisterskich

Recenzent 2 prac magisterskich na kierunku Kosmetologia i 1 pracy na kierunku Farmacja

„Ocena możliwości wykorzystania grzybów jadalnych jako źródła białka w diecie”, Julita Szymborska, Farmacja (2022)

„Ocena spożycia cynku a stan skóry studentów kierunku Kosmetologia”, Magdalena Zaręba, Kosmetologia (2020)

„Ocena spożycia wapnia wśród studentów kierunku Kosmetologia jako składnika wpływającego na stan skóry”, Natalia Podbielska, Kosmetologia (2020)

6.2. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

- Publikacje popularno-naukowe dotyczące zagadnień receptury aptecznej (37 prac opublikowanych latach 2014-2020) (wykaz prac zamieszczono w zał. 4, rozdział II, pkt. 3)

- Organizacja warsztatów dla uczniów szkół podstawowych oraz dzieci w wieku przedszkolnym woj. podlaskiego: *Farmaceuta - kto to taki?* (2018-2022)
- *Udział w projekcie „Białostockie Talenty XXI wieku”* realizowanego przez Centrum Kształcenia Ustawicznego w Białymstoku skierowanego do uczniów szkół ponadpodstawowych (maj 2019)
- Prezentacja wykładu „*Terapia homeopatyczna*” dla słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku w ramach cyklu spotkań „*Zapytaj farmaceutę*” organizowanym przez sekcję Młoda Farmacja (grudzień 2014)

6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

- Członek komitetu organizacyjnego Konkursu Receptury Aptecznej podczas konferencji naukowej „*Farmakoterapia kobiet w ciąży i elementy farmakoekonomiki*” (kwiecień 2015)
- Członek komitetu organizacyjnego *Jubileuszu 40-lecia Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej* (czerwiec 2017)
- Członek zespołu kontrolującego praktyki zawodowe na kierunku Farmacja (2017-2022)
- Członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Farmaceutycznego (2019/20) oraz Uczelnianej Komisji Rekrutacyjnej prowadzącej egzamin wstępny na I roku studiów (2021/2022)

7. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ I OSIĄGNIĘCIA ZAWODOWE

7.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W 2002 roku rozpoczęłam studia na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Białymstoku na kierunku Farmacja. Pracę magisterską zatytułowaną „*Wpływ szoku septycznego na aktywność atypowych receptorów beta-adrenergicznych w układzie krążenia szczura*” wykonaną pod kierunkiem prof. Barbary Malinowskiej obroniłam na Wydziale Farmaceutycznym w czerwcu 2007 roku, uzyskując tytuł magistra farmacji. Tematyka pracy dotyczyła zbadania roli nowych atypowych receptorów beta-adrenergicznych w nasileniu częstości akcji serca obserwowanej w ostrej fazie wstrząsu septycznego.

W 2008 roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Farmacji Stosowanej Akademii Medycznej w Białymstoku na stanowisku asystenta. Od początku moja działalność badawcza związana była z projektowaniem, sporządzaniem oraz oceną jakości mukoadhezyjnych systemów dostarczania leku. W badaniach naukowych prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora skupiłam się na technologii otrzymywania chitozanowych postaci leku z

klotrimazolem do podania dopochwowego. Tematyka pracy wykazywała potencjał aplikacyjny. Pomimo powszechnego wykorzystania klotrimazolu w terapii miejscowych zakażeń grzybiczych, na rynku farmaceutycznym brakowało zarejestrowanych mukoadhezyjnych preparatów do podania dopochwowego. W toku badań opracowałam technologię otrzymywania tabletek, hydrożeli oraz mikrocząstek, a wyniki badań nad ich oceną fizykochemiczną i farmaceutyczną opublikowałam w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.1, prace nr 3,4,7,8). Ważnym etapem było określenie wpływu polimeru na aktywność farmakologiczną klotrimazolu. W ocenie właściwości przeciwwgrzybiczych zauważono m.in., że nośniki z chitozanem wykazują per se działanie hamujące wzrost szczepów *Candida sp.*, a dodatkowo w obecności polimeru dochodziło do nasilenia działania leku (wyniki porównywano do komercyjnego preparatu z klotrimazolem). Z uwagi na właściwości higroskopijne chitozanu oraz rozkład hydrolityczny struktury polimeru, trwałość fizykochemiczna opracowanych nośników, zwłaszcza w formie półstałej okazała się mocno ograniczona. Niemniej udało mi się, poprzez modyfikację struktury chitozanu na drodze sieciowania jonowego, otrzymać trwałe fizykochemicznie nośniki chitozanowe, i osiągnąć lepszą kontrolę profilu uwalniania modelowej substancji leczniczej.

Podjęte w ramach rozprawy doktorskiej prace umożliwiły określenie wybranych czynników na właściwości fizykochemiczne, przeciwdrobnoustrojowe oraz bezpieczeństwo stosowania nośników chitozanowych. W 2016 roku przygotowałam pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Winnickiej rozprawę doktorską zatytułowaną *Ocena przydatności chitozanu jako substancji pomocniczej do sporządzania postaci leku z klotrimazolem* i 27 października 2016 roku uzyskałam tytuł doktora nauk farmaceutycznych.

7.2. Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora

Od 2017 roku kontynuowałam swoją pracę w Zakładzie Farmacji Stosowanej UMB na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego. Zainteresowanie tematyką technologii farmaceutycznej i wykorzystaniem związków polimerowych w projektowaniu nowoczesnych nośników leku stało się przedmiotem kolejnych projektów badawczych, w których pełniłam funkcję kierownika. Był to grant Miniatura 1 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „*Optymalizacja wielokompartментowych nośników zydowudyny do podania dopochwowego przy zastosowaniu glutaminianu chitozanu*” (2017/01/X/NZ7/00973) oraz projektu B+R finansowanego ze środków Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego pt. „*Badania rozwojowe nad innowacyjnym systemem dostarczania leku na błonę śluzową jamy ustnej*” (WND-RRPD.01.02.01-20-0203/20 2021-2022). Jestem również kierownikiem projektu aplikacyjnego realizowanego w ramach Inkubator Innowacyjności 4.0 z funduszy Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2020-2021 pt. „*Ocena profilu bezpieczeństwa oraz przenikania kwasu delta-aminolewulinowego z innowacyjnej kompozycji farmaceutycznej na błonę śluzową jamy ustnej*”.

We współpracy z zespołem prof. Judyty Cieleckiej-Piontek z Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu prowadziłam prace nad rolą związków

wielkocząsteczkowych w projektowaniu nośników dla surowców roślinnych pod kątem ich zastosowania miejscowo: dopochwowo lub na błonę śluzową jamy ustnej (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2, prace nr 16-19). Mój wkład opierał się na przeprowadzeniu badań mukoadhezji oraz ustaleniu zależności pomiędzy składem i metodą otrzymywania nośników, a ich zdolnością do oddziaływania ze zwierzęcym modelem błony śluzowej. Otrzymane wyniki umożliwiły sprofilowanie różnic we właściwościach mukoadhezyjnych pomiędzy formułacjami, co okazało się pomocne w wyborze nośnika o najbardziej pożądanym cechach aplikacyjnych. W pracy poświęconej analizie jakości tabletek dopoliczkowych z resweratolem – związkiem polifenolowym o właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych wykazano, że dodatek cyklodekstryn (oligosacharydów wykorzystywanych technologii jako pośredniki rozpuszczania) nie tylko poprawia rozpuszczalność i modeluje profil uwalniania związku, ale ich rodzaj ma istotne znaczenie w aspekcie siły przylegania opracowanych tabletek do zwierzęcego modelu policzka. W osobnych doświadczeniach nad charakterystyką nośników z wyciągiem z rdestowca japońskiego *Polygonii cuspidati* okazało się, że rodzaj oraz stosunek ilościowy polimerów syntetycznych (karbomeru i hydroksypropylometylocelulozy) w matrycy tabletki modyfikuje siłę oddziaływania postaci leku z błoną śluzową. Poza formami mukoadhezyjnymi, oceniałam również jakość termowrażliwych nośników leku roślinnego stworzonych w oparciu o syntetyczny blokowy kopolimer poloksamer. Układy termowrażliwe to preparaty o zdolności do zmiany konsystencji i przechodzenia z formy płynnej (lub półpłynnej) w żel pod wpływem temperatury ciała ludzkiego. Ocenę właściwości hydrożeli termowrażliwych zawierających wyciąg z korzenia tarczycy bajkalskiej *Scutalaria baikadensis* przeprowadzono pod kątem ich zastosowania w leczeniu stanów zapalnych błony śluzowej jamy ustnej. Równolegle prowadziłam badania oceny stopnia przenikania na drodze transportu biernego substancji przeciwdrobnoustrojowych. Doświadczenia prowadziłam w warunkach ex vivo przez wypreparowaną tkankę zwierzęcą oraz in vitro z użyciem biomimetycznych błon z tworzywa sztucznego (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2., prace nr 14,20). W chwili obecnej zgodnie z zaleceniami Europejskiej Agencji Leków, określenie kinetyki przenikania leków stosowanych miejscowo na skórę czy błony śluzowe stanowi ważny element prac badawczo-rozwojowych. Skład testowanych form farmaceutycznych okazał się kluczowy w aspekcie szybkości przenikania leku przez błony biologiczne. Szczególnie istotne było wykazanie, że obecność olejku z drzewa herbacianego przyczynia się do zwiększonej akumulacji ketokonazolu w naskórku, co w praktyce może potęgować jego aktywność przeciwgrzybiczą. Zgromadzone doświadczenie z zakresu technologii farmaceutycznej pozwoliły mi na lepsze zrozumienie roli poszczególnych polimerów w projektowaniu postaci leku oraz pogłębienie wiedzy w zakresie prawidłowej oceny jakościowej formułacji do zastosowania miejscowego. Ścisłe powiązane tematycznie z cyklem artykułów stanowiących podstawę do wniosku habilitacyjnego są również prace poświęcone charakterystyce kompleksów elektrolitowych (tzw. polipleksów) oraz ich zastosowaniu w technologii postaci leku (zał. 4, rozdział II, pkt. 1.2., prace 22-23). W badaniach dowiedziono m.in., że systemy dostarczania leku na błonę śluzową jamy ustnej powstałe w oparciu o

połączenia chitozanu z polimerami o przeciwnym ładunku wykazują cechy inteligentnych systemów dostarczania leku reagujących na zmiany pH śliny.

W okresie 2019-2022 odbyłam cztery krótkoterminowe wyjazdy związane z realizacją moich planów naukowych do krajowych ośrodków badawczych (Gdański Uniwersytet Medyczny, Politechnika Warszawska) oraz jednostek badawczo-rozwojowych (Centrum Naukowo-Badawcze Adamed Pharma S.A., Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris S.A.) (zał. 6). W ramach współpracy z otoczeniem gospodarczym wykonałam badania oraz ekspertyzy dla firm farmaceutycznych dotyczące oceny możliwości wdrożenia nowatorskich form farmaceutycznych z substancjami leczniczymi, jak również analizy przydatności surowców farmaceutycznych do receptury aptecznej. Jestem także twórcą pracy projektowej będącej przedmiotem umowy sprzedaży know-how (zał. 6).

Zgromadzony dorobek naukowy obejmuje: 28 publikacji naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej (w tym 3 prace poglądowe) o sumarycznym impact factor wg listy *Journal Citation Reports* IF 110,531 (MNIŚW 2156), 38 publikacji popularyzujących nauki farmaceutyczne, 1 rozdział w monografii naukowej, 20 wystąpienia konferencyjne, w tym 14 na konferencjach międzynarodowych, oraz 3 wystąpienia na wykładach na zaproszenie.

7.3. Doskonalenie zawodowe

- Od 2019 współpraca z Biurem Transferu i Technologii UMB na stanowisku broker innowacji (procedowanie umów sprzedaży know-how, badań zleconych, opieka nad projektami B+R, szkolenia z zakresu komercjalizacji i zdolności patentowej)

7.4. Doskonalenie naukowe

- Kursy i szkolenia w ramach szkolenia ciągłego farmaceutów zgodnie z aktualnym rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 20 lutego 2018 (od 2008)
- Warsztaty „Techniki *in vitro* badań biozgodności nanomateriałów” Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa (październik, 2014)
- Warsztaty “Zarządzanie badaniami naukowymi” oraz “Twórcze myślenie w pracy naukowej” Organizowanego przez Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE w Białymstoku w ramach programu "Rozwój kariery naukowej" Politechnika Białostocka (listopad, 2017)
- Szkolenie DOE: komputerowe wspomaganie planowania i analizy statystycznej badań innowacyjnych, StatSoft Polska Kraków (listopad, 2019)
- Szkolenie *In vitro permeability experiments: Experimental approaches and data interpretation in practice* InnoMe GmbH (on-line kwiecień, 2020)

- Uczestnik szkolenia UNGAP *In vitro tools for evaluating the intraluminal and absorption behavior of advanced drug formulations*, Uniwersytet Południowej Danii, Odense (on-line czerwiec 2021)
- Uczestnik programu edukacyjnego Porozumienia Akademickich Centrów Transferu Technologii i Pfizer Polska pt. „*Prowadzenie badań w zakresie nowych substancji i technologii medycznych*” (luty-czerwiec 2021)

7.5. Doskonalenie dydaktyczne

- Warsztaty „Zarządzanie Informacją Medyczną – zasady dobrych praktyk” w ramach projektu: „Rozwój kompetencji dydaktycznych pracowników Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB” finansowanego Europejskich, Wiedza Edukacja Rozwój, UMB (maj, 2018)
- Szkolenie „*Techniki prezentacji i wystąpień publicznych, a innowacyjna dydaktyka*” (styczeń 2020)
- Kurs dla kadry dydaktycznej „*Prowadzenie zajęć z wykorzystaniem metody nauczania: Problem Based Learning*” (styczeń-luty 2022)

7.6. Nagrody i wyróżnienia

- Laureat XIII edycji ogólnopolskiego konkursu „Grasz o staż” (tytuł zadania - "Projekt PPAR: innowacyjny lek w cukrzycy typu 2") (2008)
- Laureat programu TransFormation.doc realizowanego w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i pobyt w Wageningen University (Holandia)(2015)
- 9 nagród Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za działalność naukową w latach: 2014-2022

.....
Podpis